

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-199882

(43)公開日 平成5年(1993)8月10日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 1 2 N 15/53				
1/19		9050-4B		
9/06	ZNA C	7823-4B		
// (C 1 2 N 15/53		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
審査請求 未請求 請求項の数 5 (全 32 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平4-34126

(22)出願日 平成4年(1992)1月24日

(71)出願人 000216162

天野製薬株式会社

愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号

(72)発明者 安藤 啓一

茨城県つくば市御幸が丘22番 天野製薬株式会社筑波研究所内

(72)発明者 小池田 聡

茨城県つくば市御幸が丘22番 天野製薬株式会社筑波研究所内

(72)発明者 鮫島 達也

神奈川県川崎市麻生区栗平1丁目2番地18号

(54)【発明の名称】 ビリルビンオキシダーゼの製造法

(57)【要約】

【目的】ビリルビンオキシダーゼをコードする遺伝子および該遺伝子を組み込んだ形質転換体を培養することによるビリルビンオキシダーゼの製造法を提供する。

【構成】ビリルビンオキシダーゼをコードするDNAを単離精製し、該遺伝子を微生物に導入し、該組換え体を培養することによってビリルビンオキシダーゼを製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ビリルビンオキシダーゼの遺伝情報を担うDNA。

【請求項2】配列番号：1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項3】ビリルビンオキシダーゼをコードする塩基配列を複製可能な発現ベクターに連結し、該塩基配列と複製可能な発現ベクターとを含有する複製可能な組換えDNA。

【請求項4】ビリルビンオキシダーゼをコードする塩基配列を複製可能な発現ベクターに連結し、該塩基配列と複製可能な発現ベクターとを含有する複製可能な組換えDNAを得、該組換えDNAで微生物を形質転換した形質転換体。

【請求項5】ビリルビンオキシダーゼの遺伝情報を担うDNAをベクターに組み込んだ組換えDNAを微生物に導入し、該微生物を培養し、ビリルビンオキシダーゼを培養物中に産生せしめ、該培養物中よりビリルビンオキシダーゼを採取することを特徴とするビリルビンオキシダーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ビリルビンオキシダーゼ（以下、BOという）をコードする遺伝子および該遺伝子を組み込んだ組換えDNA、該組換えDNAを導入した形質転換体及び該形質転換体を培養することによるBOの製造法に関し、該BOは、分析用酵素として利用され、産業上特に重要である。

【従来の技術】BOは国際生化学連合（I. U. B）酵素委員会により、酵素番号EC 1. 3. 3. 5として分類される酵素である。BOはミロセシウム（*Myrothecium*）属、トリコデルマ（*Trichoderma*）属及びコプリナス（*Coprinas*）属等の微生物が産生することが報告されている酵素であり、ビリルビンに作用してビリベルジンを経てほぼ無色の生成物に変化せしめる反応を触媒する酵素である。その結果、ビリルビンの特異吸収（460nm付近）が減少するとともに、その還元性が消失する。また、この酵素は過酸化水素を生成しない特徴を有している。BOはその起源にもよるが、約52,000～約83,000の分子量を有している。特にミロセシウム属菌由来のBOはその酵素化学的性質も詳細に明らかにされている（特公昭60-12032号）。このようにBOはビリルビンに作用してビリルビンを分解する酵素であることから、特に体液中のビリルビン定量用診断薬として応用され、肝疾患等の診断に利用されている。更に血清中ビリルビンによる測定干渉作用を除去するためにビリルビンの消去用として各種の生化学検査用試薬に利用されている。その他、BOは各種の方面（例えば、医薬、洗剤など）にも応用が図られている。BOは前記に述べたようにミ

ロセシウム属、トリコデルマ属及びコプリナス属等の微生物から生産されているが、現在ではBO遺伝子についての解析は全くなされていないのである。また、組換え体BOの製造に関する研究も従来では全くなされていないのが現状である。よって、遺伝子操作によりこれらのBOを大量に、安価に生産する方法の開発が要望されていた。

【発明が解決しようとする課題】従来、BOは前述したような微生物を培養することによって製造されているため、供給量、供給費用などの点で改善すべき点が多くあった。本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意研究の結果、BOをコードするDNAを精製・単離し、その塩基配列を決定することに成功した。更に該遺伝子を組み込んだ形質転換体を得、該形質転換体を培養することによってBOを製造する方法を完成した。かかる成果に基づいてBOの効率的な大量生産への途を開き、さらには、蛋白質工学によるBOの特異性の改変への途をも開いた。

【課題を解決するための手段】本発明は、BO遺伝子をコードするDNAに関するものであり、更に該遺伝子を組み込んだ形質転換体を培養することによるBOの製造方法に関する。

即ち、配列番号：1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを提供するものである。かかるDNAは、遺伝コドンの縮重を考慮すると、種々の塩基配列を包含し得る。これらの塩基配列は、遺伝子発現系の諸要素、例えば宿主細胞の種類等に応じた優先コドン等によって当業者が容易に選択し得るものである。

配列番号：1に示したDNAの取得方法も化学的合成法も含めて種々のものが考えられる。例えば、PCR（Polymerase Chain Reaction）法により得られたDNA断片をプローブとして用い、ゲノムDNA等からイントロンを含む遺伝子をクローニングした後、イントロンを含まないcDNAを、例えばPCR法により得ることができる。これらの遺伝子はBOを生産する微生物より以下の実施例に述べる方法により単離できる。微生物としては、BOを産生するものであればいずれでも良いが、例えばミロセシウム属、トリコデルマ属及びコプリナス属等の微生物が使用できる。好ましくはミロセシウム属が挙げられ、より好ましくは、ミロセシウム・ベルカリア（*Myrothecium verrucaria*）MT-1（本菌株は工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されその寄託番号は微工研条第653号である。）が使用できる。以下、本発明をミロセシウム・ベルカリアMT-1由来のBOの場合を例にとり、実施例を参照しながら詳細に説明する。尚、トリコデルマ属及びコプリナス属等の微生物から生産されているBOの場合についても、本発明と同様の過程を踏み、プライマー等を適当にデザインすることによって容易に実施できる。よって、本発明は以下に記載す

る実施例に限定されるものではない。

【実施例】

実施例1 BOのcDNAクローニング

①菌体の取得

まずBOを分泌発現する生産菌を以下の如く培養した。培養の為の培地には以下に示すポテトグルコース培地を使用した。

ポテトグルコース培地の作製法

1 馬鈴薯の皮及び芽をとり約1cmの角切りにしたのち、400gを上皿天秤で秤量してステンレスバットに

入れる。
2 脱イオン水1000mlをメスシリンダーで量り、上記のステンレスバットに加え、アデカノールLG-126（旭電化工業製）を3滴添加する。

3 ガスコンロではじめ強火で沸騰させ、その後は弱火で2時間煮沸する。その後、流水中で冷却する。

4 冷却後、ガーゼ2枚でろ過する。

5 ろ液を1000mlに脱イオン水でフィルアップし、グルコースを10g加えて溶解する。

6 121℃で、30分間オートクレーブする。

上記の如く作製されたポテトグルコース培地2mlに、孢子形成を行っていないミロセシウム・ベルカリアMT-1（以下、BO生産菌という。）を接種して140rpmで30℃、3日間振盪培養した。次にこの培養液2mlを同ポテトグルコース培地100mlに接種し、140rpmで30℃、3日間振盪培養した。更に、この培養液2mlを500mlの同ポテトグルコース培地の入った坂口フラスコに接種して、125rpm、25℃で振盪培養した。培養の間、培養液を経時的にサンプリングして、その上清に含まれるBOの発現量の変動を、下記に示す測定法によりBO活性を測定し、BO活性が高い培養液を回収した。

BO活性測定法

エチレンジアミン四酢酸1mMを含む0.2M-トリス塩酸緩衝液250mlに試薬ビリルビン（和光純薬工業製）5mgを溶解し、この2mlと酵素液0.2mlを37℃で反応させ440nmの吸光度の減少を測定する。この培養液から菌体を遠心分離（12000×g、15分）により菌体を回収し、-80℃に凍結保存して以下の実験に供した。

②菌体から全RNAの調製法

全RNAは、グアニジウム／塩化セシウム法〔バイオケミストリ（Biochemistry）、13、2633（1974）〕、[サイエンス（Science）、196、1313（1977）]、[モレキュラー クローニング（Molecular Cloning）（1982）]に従って調製した。①で得られた菌体10gと海砂（20～35メッシュ、和光純薬製）5gを混合し、すり鉢の中で液体窒素と共に菌体を粉碎した。得られた粉碎物を40mMの4M グアニジンチ

オシアネート（フルカ製）、200mM 酢酸ナトリウム（和光純薬製）、5mM EDTA（ドウジン製）を含む溶液に加え、室温で15分間振盪混合させた。得られた混合物を30mlのコーニングチューブに分配し、遠心分離（10,000rpm、15分）を行なった。次に予め4mlの5M 塩化セシウム（和光純薬製）の入った遠心チューブ6本に、得られた上清を6mlずつ重層し、超遠心分離（37,000rpm、18時間）を行なった。その結果、チューブの底に透明な沈殿物を得た。この沈殿物を80%エタノールで2回洗浄し乾燥させ、1チューブあたり80μlの10mM トリス-塩酸緩衝液（pH7.6）、10mM EDTA、0.5% SDSを含む溶液に溶かした。次に6本分を1本のチューブに集め、10mM トリス・塩酸緩衝液（pH8.0）（1mMのEDTA含有）（以下、TEという）、飽和フェノール及びクロロホルムで2回ずつ抽出し、最後に得られた水層に1/10容量の3M 酢酸ナトリウム（pH5.2）溶液と2倍容量のエタノールを加え、-20℃に1時間おいた。その後、遠心分離（12,000×g、15分）により沈殿を回収し、沈殿を80%エタノールで洗浄し、乾燥させた。これを滅菌蒸留水200μlに溶かし以下の実験に使用した。尚、最終的に得られた全RNA量は約2mgであった。

③全RNAからpoly(A)+RNAの調製法

②で得られた全RNA1.2mgからmRNA Purification Kit（ファルマシア社製）を用いてpoly(A)+RNAを12μg回収した。

④BO蛋白のアミノ末端部分の配列とBO蛋白をプロテアーゼで切断したペプチドのアミノ酸配列の決定

(I) BO蛋白のアミノ末端部分のアミノ酸配列の決定

(i) BO蛋白の還元カルボキシメチル化
ミロセシウム・ベルカリアMT-1由来の精製したBO蛋白5mgを3mlの6M グアニジン塩酸と2mM EDTAを含む0.5Mトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）に溶解し、50℃で2分間処理した後、室温で24時間放置した。放置しておいた反応液に0.6mgのDTT（ジチオスレイトール）と1.5mgのヨード酢酸を加え暗所で30分反応させた後、透析チューブに移し、暗所でイオン交換水に透析した。得られた透析内液を凍結乾燥し、以下の実験に用いた。

(ii) アミノ酸配列の決定

(i) で得られた試料の適量を液相法プロテインシーケンサー（アプライド・バイオシステム社製）あるいは固相法プロテインシーケンサー（ミリジェン・バイオサーチ社製）にかけ、得られたデータからアミノ酸配列（配列番号：2）を決定した。

(II) BO蛋白をプロテアーゼで切断したペプチドのアミノ酸配列の決定

(i) トリプシン分解断片の取得とアミノ酸配列の決定
(I) の (i) で示したようにBO蛋白を還元カルボキ

シメチル化した試料を5mMの炭酸水素アンモニウム (pH7.9) に溶解し、TPCK-トリプシン (ベーリンガー・マンハイム製) をBO蛋白量の1/50モル量加え、37℃で6時間処理し、さらに同量のTPCK-トリプシンを加え37℃で24時間処理した反応液を塩酸でpH2に調整した。トリプシン分解断片は、得られたトリプシン分解反応液の適当量をHPLC逆相クロマトグラフィー (μBondasphere C18-100Aカラム) を行なうことにより分画し取得した。尚、HPLCの条件は下記の通りである。

A液: 0.5%トリフルオロ酢酸/水

B液: 0.5%トリフルオロ酢酸/50%アセトニトリル/水

グラジェント: 0-100%B液のリニアグラジェント
流速: 0.5ml/分

分画し得られたトリプシン分解断片の内、(I)の(ii)と同様のプロテインシーケンサーを用いて4種類の断片のアミノ酸配列 (配列番号: 3~配列番号: 6) を決定した。

(ii) V8プロテアーゼ分解断片の取得とアミノ酸配列の決定

(I)の(i)で示したようにBO蛋白を還元カルボキシメチル化した試料を5mMの炭酸水素アンモニウム (pH7.9) に溶解し、V8プロテアーゼ (*Staphylococcus aureus*由来: ベーリンガー・マンハイム製) をBO蛋白量の1/50モル量加え37℃で6時間処理し、さらに同量のV8プロテアーゼを加え37℃で24時間処理した反応液を塩酸でpH2*

A A
プライマー#1 5' -GGGAATTCNATTCCTCCIGTIAA CA- 3' (N=A,G,C,T)
C G (I:イノシン)

次に④の(II)で得られたBO蛋白をトリプシンで分解した断片のうち、1つの断片のアミノ酸配列 (配列番号: 3) に対応する塩基配列を予想してDNAを合成した。尚、5' 側には、PCR産物のDNA断片をサブクロニングし易くするために制限酵素BamHIの認識※

A A A GA T
プライマー#2 5' -CGGGATCC TC TCIGC TAIGGIC TA TC- 3'
G G G TG C (I:イノシン)

合成したDNAはそれぞれ200μlのTEに溶解し、PCR法のプライマーとして使用した。

(ii) PCR法に用いた鋳型DNAの調製

②で得られた全RNA10μl (0.5μg) と20μMのOligomer (dT)₁₅ (ベーリンガー製) 3μlを500μl容量のチューブ内で混合し、70℃で★

[5×] reverse buffer (BRL製)	4μl
0.1M DTT (BRL製)	2μl
RNasin (20units) (Promega製)	1.5μl
2.5mM NTPs (TOYOBO製)	8μl
MMTV Reverse Transcriptase	

*に調整した。V8プロテアーゼ分解断片は、得られた分解反応液の適当量を、トリプシン分解の場合と同様にHPLC逆相クロマトグラフィーを行なうことにより分画し取得した。尚、分画条件も同様である。分画し得られたV8プロテアーゼ分解断片の内、(I)の(ii)と同様のプロテインシーケンサーを用いて6種類の断片のアミノ酸配列 (配列番号: 7~配列番号: 12) を決定した。

⑤PCR (Polymerase Chain Reaction) 法によるDNA断片の取得

BOのcDNAを含む特定のDNA領域を、最近開発されてきたPCR法〔サイエンス (Science), 230, 1350 (1985)〕、メソッドイン エンザイモロジー (Method in Enzymology), 155, 335 (1987)〕によって、単離増幅した。

(I) BO蛋白の一部に対応するDNA断片の取得

(i) PCR法に用いたプライマーDNAの合成

④の(I)で決定されたBO蛋白のアミノ末端配列 (配列番号: 2) の16番目のプロリンから22番目のグルタミンに対応する塩基配列を予想し、DNAを合成した。尚、5' 側には、PCR産物であるDNA断片をサブクロニングし易くするために、制限酵素EcoRIの認識配列を加えてある。以下に示す全てのDNA合成には、0.2μMスケールでサイクロプラスDNA合成機 (ミリジェン・バイオサーチ社製) を使用した。このDNAをPCR法のプライマー#1とした。プライマー#1の配列を以下に示す。

※配列を加えてある。配列番号: 3の6番目のグルタミン酸から12番目のアラニンに対応するDNAの相補的配列をPCR法のプライマー#2とした。プライマー#2の配列を以下に示す。

★10分間インキュベートした後、すぐに氷中で冷やした。次に、この得られた混合物4μlに対し以下の試薬を混合し、37℃で45分間インキュベートした。この反応物をPCR法の鋳型DNAとした。以下、この反応物を1st DNA mixという。

(200 units) (BRL製)

1 μ l

(iii) PCR法によるDNA断片の増幅

*1 Cyclor (DNA増幅装置) により行なった。

反応は、Gene Amp™ Kit (パーキンエルマ
ージャパン社製) を用い、同社のDNA Thermo*

反応溶液の組成は以下の通りである。

H ₂ O	58.5 μ l
[10x] Reaction Buffer	10 μ l
dNTPs, mix 1.25mM	16 μ l
プライマー#1	5 μ l
プライマー#2	5 μ l
1st DNA mix	5 μ l
Ampli Taq™ DNA polymerase	
(5 units/ μ l)	0.5 μ l

上記の反応液100 μ lを混合し、ミネラルオイル(シ
グマ社製)100 μ lを加えた。次に反応液の入ったチ
ューブをDNA Thermal Cyclorにセッ
トし、以下の条件で反応を行なった。

95℃ 0.5分

37℃ 0.5分

72℃ 3分

この条件下で反応を40サイクル行なった後、更に72℃で7分間インキュベートした。

(iv) 増幅されたDNAの回収

反応後、ミネラルオイルを除き、100 μ lのクロロホルムを加え混合し、遠心分離(15,000 rpm、2分)を行ない、上清を100 μ l回収した。このうち10 μ lを用いて1%アガロース電気泳動で回収されたDNAのサイズと量を確認した。その結果約1.5 KbpのDNA断片が約2 μ g増幅されていることがわかった。残りの90 μ lを1%アガロース電気泳動にかけ、1.5 Kbpに相当するバンドを切りだし、DNA精製キット(BIO 101社製)、GENECLEAN IIでこのDNAを抽出した。この操作で約1 μ gのDNA断片が回収された。以下、このDNA断片をBO-Aという。

(v) PCR法で増幅されたDNAの塩基配列の決定
まず、(iv)で得られたBO-Aを制限酵素EcoRI、あるいはBamHIで切断し、1%アガロース電気泳動でサイズを確認した。このBO-AはBamHIで切断されることがわかった。したがって、制限酵素処理しないBO-Aと、適当量をあらかじめ制限酵素SmaIで切断した市販のプラスミドpUC19(TOYOBO製)[ジーン(Gene), 33, 103(1985)]と混合し、ライゲーションキット(宝酒造製)を用いて16℃、18時間連結反応を行なった。次にこの混合物で大腸菌DH5 α を形質転換した[ジャーナルオブモレキュラーバイオロジー(J. Mol. Biol.), 166, 577(1983)]。得られた形質転換体より、プラスミドを調製し、pUC19にBO-Aが導入されたプラスミドpUCBO-Aを得た。次に、塩基配列決定のための方向を調べるために、※50

※各種制限酵素でpUCBO-Aを切断し、BO-Aの制限酵素地図を作製した。図1の上段のスケールはDNA断片のサイズを示し、枠で仕切られたBO-Aの上部に、制限酵素認識部位を示し(例えば BglII、BamHI等)、枠の右端にBO-Aを含むプラスミド名としてpUCBO-Aを示した。次に、塩基配列決定のためのサブクローニングを、得られたBO-Aの制限酵素地図を基にして行なった。塩基配列決定の鋳型DNAは、M13ファージ(M13mp18、M13mp19)のRF DNAにDNA断片をクローニングし、一本鎖DNAとして回収したり[メソッドインエンザイモロジー, 101, 20(1983)]、pUC18、pUC19やpHSG396、pHSG397(いずれも宝酒造製)のプラスミドにクローニングし、二本鎖DNAとして回収し、鋳型DNAとした。塩基配列は、得られた鋳型DNAを[α -³²P] dCTPと7-Deaza-Sequencing Kit(USB社製)を用いる従来公知の方法や蛍光物質利用したTaq Dye Primer Cycle Sequencing Kit(ABI社製)、DNA増幅装置(パーキンエルマー・シータス社製)及びDNA Sequencer 373A(ABI社製)を用いる方法で決定した。図1において枠で仕切られたBO-Aの下部に塩基配列決定の方向と距離を示した。決定されたBO-Aの塩基配列は、配列番号: 13に示した219番目のCから1771番目のCに相当する。この塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号: 13の塩基配列の下に示した。このアミノ酸配列とBO蛋白のアミノ末端配列(配列番号: 2)の一部(16番目のアロリンから25番目のロイシン)やプロテアーゼで分解した断片のアミノ酸配列(配列番号: 3から配列番号: 12)の一致が認められる。一致しているアミノ酸配列部分を配列番号: 13に下線で示した。従って、得られたBO-Aは、目的のBO蛋白のcDNAの一部分である。

(II) BO蛋白のカルボキシル末端部分に対応する3'側のcDNA断片の取得

(i) PCR法に用いたプライマーDNAの合成

(I)の(v)で決定されたBO-Aの塩基配列のう

ち、特異的配列(配列番号:13の1692番目のCから1716番目のGまで)のDNAを合成した。このDNAをPCR法のプライマー#3とした。尚、(I)の*

プライマー#3 5'-TCGAATTCAGGCTCAGAGTGGCCAGTTCAGCG-3'

もう一方のプライマーは、poly(A)+RNAの3'側のpoly(A)配列を利用したPCR法を行なうために、3つの制限酵素認識部位(5'からClaI、HindIII、SalI)のみを持つDNAを合成し、このDNAをPCR法のプライマー#4とした。プライマー#4の配列を以下に示す。プライマー#4

5'-GATCGATAAGCTTGTGCGACT-3'合成したDNAはそれぞれ200μlのTEに溶解し、PCR法のプライマーとして使用した。

(ii) PCR法に用いた鋳型DNAの調製

まず、(I)の(ii)で使用したOligomer

(dT)₁₅に代えて、5'側にさらにプライマー#4の※

[5×] reverse buffer (BRL製)	4μl
0.1M DTT (BRL製)	2μl
RNasin (20units) (Promega製)	1.5μl
2.5mM dNTPs (N=A, G, C, T)	
(TOYOBO)	8μl
MMTV Reverse Transcriptase	
(200units) (BRL製)	1μl

(iii) PCR法によるDNA断片の増幅

反応溶液の組成は以下の通りであり、DNA増幅キッ ★

H ₂ O	58.5μl
[10×] Reaction Buffer	10μl
dNTPs, mix 1.25mM	16μl
プライマー#3 (20μM)	5μl
プライマー#4 (20μM)	5μl
1st DNA mix (c)	5μl
Ampli Taq™ DNA polymerase	
(5units/μl)	0.5μl

(iv) PCR法で増幅されたDNAの回収と塩基配列の決定

(I)の(iv)と同様に、回収した反応液10μlを用いて1.5%アガロース電気泳動で増幅されたDNAのサイズと量を確認した。その結果、約290bpのDNA断片が約2μg増幅されていることがわかった。残りの90μlを1.5%アガロース電気泳動にかけ、290bpに相当するバンドを切りだし、DNA精製キット、MERMAID™ Kit (BIO 101社製)でこのDNAを抽出した。この操作で約0.5μgのDNA断片が回収された。以下、このDNA断片をBO-Bという。次に得られたBO-Bを制限酵素EcoRIとHindIIIで切断し、あらかじめ同じ制限酵素で切断したプラスミドpUC19にサブクローニングした。その結果得られたBO-Bを含むプラスミドpUCBO-Bの塩基配列を決定した。この場合の塩基配列決定は7-Deaza-Sequencing-Kit ☆

(i)と同様に5'側には制限酵素EcoRIの認識配列を付けてある。プライマー#3の配列を以下に示す。

※配列をもつDNAを合成し、得たDNAを1st str and cDNA合成に用いるプライマー#5とした。

プライマー#5の配列を以下に示す。

プライマー#5 5'-GATCGATAAGCTTGTGCGAC(T)₁₇-3'

②で得られた全RNA10μl(0.5μg)と20μMのプライマー#5、3μlを500μl容量のチューブ内で混合し、70℃で10分間インキュベートした後、すぐに氷中で冷やした。次に、この得られた混合物4μlに対し以下の試薬を混合し、37℃で45分間インキュベートした。この反応物をPCR法の鋳型DNAとした。以下、この反応物を1st DNA mix (c)とする。

★ト、DNA増幅装置、増幅反応条件は、(I)の(iii)と同様である。

☆ (USB社製)を用いる従来公知の方法でおこなった。

図1において枠で仕切られたBO-Bの上部に制限酵素認識部位、下部に塩基配列決定の方向と距離を示し、枠の右端にBO-Bを含むプラスミド名としてpUCBO-Bを示した。決定されたBO-Bの塩基配列は、配列番号:13に示した1692番目のCから1959番目のAに相当する。BO-AとBO-Bの塩基配列を比較すると1692番目のCから1771番目のCが完全に一致すること、この塩基配列から予想されるアミノ酸配列とBO蛋白をV8プロテアーゼで分解した断片の配列の内、配列番号:7の配列と一致すること、その配列のすぐ後にストップコドン(配列番号:13の塩基配列で1782番目から1784番目)が現われ、3'末端にポリ(A)配列が存在することから、BO-Bは、目的のBO蛋白のカルボキシル末端部分に対応する3'側のcDNA断片である。

(III) BO蛋白のアミノ末端部分に対応する5'側

のcDNA断片の取得

(i) PCR法に用いたプライマーDNAの合成
(I)の(v)で決定されたBO-Aの塩基配列のうち、以下に示す特異的配列(配列番号:13の322番*

プライマー#6 5'-CGGATCCAAGGTCAGGGTAAACCTGGT-3'

PCR法の鋳型DNAの合成をSuperScript™ Plasmid System (BRL社製)を用いて行なうと、2本鎖cDNA混合物の5'末端にSal Iアダプターが導入される。従って、もう一方のプライマーは、この配列を利用することにした。以下に示す配列を合成し、PCR法のプライマー#7とした。プライマー#7の配列を以下に示す。

プライマー#7 5'-TCGACCCACGCGTCCG-3'

合成したDNAはそれぞれ200μlのTEに溶解し、PCR法のプライマーとして用いた。

(ii) PCR法に用いた鋳型DNAの調製とDNA断片の増幅 ※

H ₂ O	60.5μl
[10×] Reaction Buffer	10μl
dNTPs, mix 1.25mM	16μl
プライマー#6 (20μM)	5μl
プライマー#7 (20μM)	5μl
cDNA mix	3μl
Ampli Taq™ DNA polymerase (5 units/μl)	0.5μl

(iii) PCR法で増幅されたDNAの回収と塩基配列の決定

(II)の(iv)と同様にDNAを回収し、その結果、約350bpのDNA断片が、約0.5μg得られた。以下、このDNA断片をBO-Cという。次に得られたBO-Cを制限酵素Sal IとBamHIで切断し、あらかじめ同じ制限酵素で切断したプラスミドpUC19にサブクローニングした。その結果得られたBO-Cを含むプラスミドpUCBO-Cの塩基配列を決定した。この場合の塩基配列決定は7-Deaza-Sequencing-Kit (USB社製)を用いる従来公知の方法でおこなった。図1において枠で仕切られたBO-Cの上部に制限酵素認識部位、下部に塩基配列決定の方向と距離を示し、枠の右端にBO-Cを含むプラスミド名としてpUCBO-Cを示した。決定されたBO-Cの塩基配列は、配列番号:13に示した1番目のAから348番目のGに相当する。BO-AとBO-Cの塩基配列を比較すると219番目のCから348番目のGまでの配列が完全に一致すること、この塩基配列から予想されるアミノ酸配列(配列番号:13の塩基配列では180から254番に相当する)とBO蛋白のアミノ末端配列が一致することから、BO-Cは、BO蛋白のアミノ末端部分に対応する5'側のcDNA断片である。以上、得られたBO-A、BO-B及びBO-CのDNA断片のオーバーラップする塩基配列部分を考慮 ★50

*目から348番目)の相補的配列のDNAを合成した。このDNAをPCR法のプライマー#6とした。プライマー#6の配列を以下に示す。

※③で得られたpoly(A)⁺RNAを2.5μg使用して、SuperScript™ Plasmid System (BRL社製)により2本鎖cDNA合成し、Sal Iアダプターの付加及び制限酵素Not Iで切断した反応液をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿、乾燥を行ない、最終的にTE50μlに溶解させたサンプルを鋳型DNAとした。以下この鋳型DNAをcDNA mixという。PCR法の反応溶液の組成は以下の通りであり、DNA増幅キット、DNA増幅装置、増幅反応条件は、(I)の(iii)と同様である。

★し、結合させた全体の塩基配列を配列番号:13に示した。塩基配列の下段には塩基配列から予想される、66番目から68番目の開始コドンであるATGから始まり終止コドンである1782番目から1785番目のTAGで終了する最も長いオープンリーディングフレームを示してある。BO蛋白部分はこのフレーム内に存在する。したがって、BO蛋白は、572個のアミノ酸から成る前駆体として翻訳されと考えられる。配列番号:13に示したアミノ酸配列部分のうち1番目のメチオニンから約20のアミノ酸は比較的水溶性に富んだアミノ酸が並んでいることから、分泌蛋白質に一般的に見られるシグナル配列と考えられる。BO蛋白のアミノ末端アミノ酸はバリンであり、その前には2つの塩基性アミノ酸(Lys-Arg)が存在している。このアミノ酸配列は、BO前駆体から成熟体(BO蛋白)へのプロセッシングに必要な配列と考えられる。

配列番号:13で示した最も長いオープンリーディングフレームを、配列番号:1にアミノ酸の3文字表記で示した。BO蛋白のアミノ末端配列(配列番号:2)やプロテアーゼ分解断片の配列(配列番号:3~配列番号:12)を下線で示した。したがって、BO蛋白側からの得られた配列と、得られたcDNAから予想されるアミノ酸配列とを総合して考えると、BO蛋白の一次構造は、39番目のバリンから572番目のグルタミン酸まで534個のアミノ酸より成ると考えられる。

13

⑥ノザンブロッティング法によるBOのmRNAのサイズの同定

ノザンブロッティングは、ホルムアルデヒド法により行なった。〔[バイオケミストリー, 16, 4743 (1977)]、[プロシーディング オブ ザナショナル アカデミー オブ サイエンス オブ ザ USA, 77, 5794 (1980)]、[モレキュラー クローニング (1982)]〕

③で得られたpoly (A)⁺RNAのうち2.5μgを変性条件下で1.2%アガロース電気泳動し、ブロッティングし、ベイクしたニトロセルロースフィルターと、⑤の(I)の(iv)で得られたプラスミドpUCBO-Aを制限酵素EcoRIとHindIIIで切断し、アガロース電気泳動にかけ切りだし抽出した、約1.5kbpのBO-AのDNA断片の適当量を[α-³²P] dCTPでMuitiprime™ DNA Labelling system (アマシャム社製)により標識化したDNA断片とをハイブリダイゼーションさせ、15mM 塩化ナトリウム、1.5mM クエン酸ナトリウムと0.1% SDSを含む溶液で42℃で30分間洗浄し、風乾させたフィルターのオートラジオグラフィを行なった。その結果を図2に示した。同時に電気泳動したRNAのサイズマーカーから算定された約2kbの位置に1本バンドが出現した(図2に矢印で示す)。従って、BOのmRNAのサイズは、約2kbであり、⑤の(I)~(III)で得られたBO-A、B*

H ₂ O	60.5μl
[10×] Reaction Buffer	10μl
dNTPs, mix 1.25mM	16μl
プライマー#8 (20μM)	5μl
プライマー#9 (20μM)	5μl
(III)の(ii)のcDNA mix	5μl
Ampli Taq™ DNA polymerase (5 units/μl)	0.5μl

(ii) PCRで増幅されたDNAの回収と塩基配列の決定

(II)の(iv)と同様にDNAを回収し、その結果、約1.9kbpのDNA断片が、約1μg得られた。以下、このDNA断片をBO-fullという。次に得られたBO-fullを、あらかじめ制限酵素SmaIで切断したプラスミドpUC19にサブクローニングし、BO-fullを含むプラスミドを得た。以下、このプラスミドをpUC-BOという。次にBO-fullの制限酵素地図を作製し、その地図に基づき塩基配列決定のためのサブクローニングを行なった。⑤の(v)のように、塩基配列決定の鋳型DNAは、M13ファージ(M13mp18、M13mp19)のRF DNAにDNA断片をクローニングし、一本鎖DNAとして回収したり[メソッド イン エンザイモロジー, 101, 20 (1983)]、pUC18、pUC19※50

14

*O-B及びBO-Cを組合せて得られた配列番号: 13のDNAのサイズと一致する。このことは、BOのmRNAは一種類であり、配列番号: 13に示されたDNA配列がBOのmRNA配列をDNAに変換した配列と考えることができる。

⑦前駆体部分と成熟体のBO (BO蛋白) 部分の全体を含むDNA断片の取得

⑤で得られた結果から、BO蛋白に対するmRNAは一種類であり、⑤の(II)と(III)で得られたBO-BとBO-Cの塩基配列を利用すれば、オープンリーディングフレーム (配列番号: 1) 全体を含むひと繋りのDNA断片として取得できる。このDNA断片の取得はPCR法によって行なった。

(i) PCR法によるオープンリーディングフレーム全体を含むDNA断片の増幅

⑤の(III)で得られたBO-Cの塩基配列の内、配列番号: 13の第12番目のTから第36番目のTまでの配列と第1878番目のCから第1902番目のGまでの配列の相補的配列のDNAを合成した。それぞれの合成DNAをPCRのプライマー#8、プライマー#9として用いた。また、⑤の(III)で得たcDNA mixをPCRの鋳型DNAとした。PCRの反応溶液の組成は以下の通りであり、DNA増幅キット、DNA増幅装置、増幅反応条件は、(I)の(iii)と同様である。

※やpHSG396、pHSG397 (いずれも宝酒造製)のプラスミドにクローニングし、2本鎖DNAとして回収し鋳型DNAとした。この場合の塩基配列決定は、蛍光物質利用したTaq Dye Primer Cycle Sequencing Kit (ABI社製)、DNA増幅装置 (パーキンエルマー・シートス社製) 及びDNA Sequencer 373A (ABI社製)を用いる方法でおこなった。図1において枠で仕切られたBO-fullの上部に制限酵素認識部位、下部に塩基配列決定の方向と距離を示し、枠の右端にBO-fullを含むプラスミド名としてpUC-BOを示した。決定されたBO-fullの塩基配列は、配列番号: 13に示した第12番目のTから第1902番目のGまで、完全に一致した配列であった。したがって、このPCRにより配列番号: 1に示したアミノ酸配列に相当する塩基配列を全て含むDNA断片を得ることがで

きた。図1において枠で仕切られたBO-fu11には、BO蛋白に対応する領域を斜線で、シグナルペプチドに相当する部分を含む領域をPreProとして示した。また、BO蛋白のアミノ末端に相当する部分をN、カルボキシル末端に相当する部分をCと示した。このBO-fu11と名付けたDNA断片含むプラスミドpUC-BOを、実施例2に示す酵母での組み換えBOの発現に必要なプラスミド構築の材料とした。

実施例2

①実施例1で得られたDNAを導入した酵母における組*10

プライマー#10 5'-GGTAAGCTTGGATAAAAGAGTTGCCAGATCAGCCACAG-3'

プライマー#11 5'-CGGAATTCTTACTCGTCAGTCGCGCG-3'

PCR法の反応はGene Amp™ kit (パーキンエルマージャパン社製)を用い、同社のDNA Thermal Cyclerにより行なった。反応液の組成は同キットに添付されている説明書に記載されている方法に従った。反応液の入ったチューブをDNA Thermal Cyclerにセットし、以下の条件で反応を行なった。

95℃ 0.5分

37℃ 0.5分

72℃ 3分

この反応条件下で反応を35サイクル行なった後、さらに72度で7分間インキュベートした。反応後、反応液を取り出しこれをクロロホルムにて抽出した。次いで、これを1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅されたDNAのサイズと量を確認した。その結果、約1.6kbpのDNA断片が約1μg増幅されていることがわかった。この1.6kbpのバンドを含むゲルを切りだして、Gene clean II Kit (BIO 30

101社製)を用いて、キットに添付されている説明※

プライマー#12 5'-GCCTCGAGTTTCATACACAATATAAACGACCAAA-3'

プライマー#13 5'-GGAAGCTTACCCCTTCTTCTTAGCAGCAATGCT-3'

ここで、プライマー#12は制限酵素XhoIのサイトをプライマー#13は制限酵素HindIIIのサイトを含んでいるので、得られたDNA断片をXhoIとHindIIIで消化することにより、α因子のシグナルペプチドの塩基配列を含んだDNA断片の両末端に、それぞれXhoIサイトとHindIIIサイトを導入できる。得られたDNA断片をXhoIとHindIII 40で消化して、これとブルースクリプトks⁻ (Stratagene社製)をXhoI、HindIIIで消化したラージフラグメントをライゲーションした。ライゲーション反応はライゲーションキット(宝酒造製)を用いてキットに添付されている説明書に従って行なった。ライゲーション後、反応液で大腸菌DH5を形質転換した。形質転換はコンピテントセルDH5(東洋紡製)を用いて公知の方法[モレキュラー クローニング(1982)]により行なった。形質転換の結果、得られたア★

プライマー#14 5'-CCGAATTCATTGAATTGAATTGAAATCGATAGA-3'

*み換えBOの発現

まず、プラスミドpUC-BOのうち成熟タンパク部分に相当すると予想される塩基配列を、下記プライマー#10、プライマー#11を用いてPCR法により増幅した。プライマー#10には後述するプラスミドヘクローニングが容易なように、酵母α因子のシグナルペプチドの塩基配列の一部(HindIIIサイトを含む)が含まれている。またプライマー#11にはストップコドンとEcoRIサイトが含まれている。プライマー#10、プライマー#11の配列を以下に示す。

※書に従ってDNAを抽出し回収した。回収したDNAを次に制限酵素EcoRIとHindIII(いずれも東洋紡製)にて消化し、アガロース電気泳動を行なって、約1.6kbpのDNA断片をGene clean II Kitを用いて回収した。得られた1.6kbp DNA断片を発現させるために、酵母において分泌発現が可能ないように、分泌発現に必要なシグナルペプチドの塩基配列と転写の終結に必要な塩基配列(ターミネーター)を1.6kbp DNA断片に結合した。まず、α因子のシグナルペプチド部分の塩基配列を前述のPCR法を用いて増幅し単離した。すなわち、酵母のゲノムDNA(Clontec社より購入)を鋳型DNAとしプライマー#12、#13を用いてα因子のシグナルペプチド部分の塩基配列を増幅した。増幅後、前述したように反応液をアガロース電気泳動して、増幅したDNA断片を確認して、これをMERMAID kitを用いて抽出し回収した。その結果、約0.5μgの約300bpのDNA断片を得た。

★ンビシリン耐性の菌株よりプラスミドDNA(以下、pBαとする)を公知の方法にて調製した。次にこのpBαをHindIIIとEcoRIで切断して得られたラージフラグメントと、前述したPCR法で増幅された1.6kbp DNA断片をHindIIIとEcoRIで切断したフラグメントをライゲーションした。ライゲーション後、前述したようにこれを用いて大腸菌DHαを形質転換した。得られた形質転換体より前述と同様にプラスミドを調製した。このプラスミドをpBOαとし、以下の実験に用いた。次にpBOαの挿入DNA断片の下流に、酵母PGK遺伝子のターミネーター配列を組み込んだ。そのためにPGK遺伝子のターミネーター配列をPCR法で増幅し単離した。鋳型DNAとしては酵母ゲノムDNAを、プライマーとしては下記に示したプライマー#14、#15を用いた。

17

プライマー#15 5'-CCGGATCCGCATGCGATATCGGTTTTTCGAAACGCCAGAATTTTCGA-3'

増幅後、反応液をアガロース電気泳動して増幅したDNA断片を確認して、これをMERMAID kitを用いて抽出し回収した。その結果、約0.5μgの約300bpのDNA断片を得た。プライマー#14はEcoRIサイトをプライマー#15はSphI、BamHIサイトを含んでおり、得られた断片をEcoRIとBamHI（いずれも東洋紡製）で消化することにより、PGK遺伝子のターミネーター配列の両端に、それぞれEcoRIサイトとBamHIサイトを導入することができ、得られたPGK遺伝子のターミネーター断片を、EcoRIとBamHIで消化し、これと前述のpBSαをEcoRIとBamHIで消化したラージフラグメントを同様にライゲーションし形質転換を行なった。得られたアンピシリン耐性の菌株よりプラスミドDNAを調製し、これをpBOGSαとし、以下の実験に供した。このようにして作製された融合遺伝子が、α因子の開始コドンであるメチオニンから順次アミノ酸に翻訳されると、グリシン-バリン-セリン-ロイシン-アスパラギン酸-リシン-アルギニン-バリン-アラニン-グルタミン-イソロイシン-セリン-プロリンという配列になる。このうち最初のグリシンから7番めのアルギニンまではα因子のアミノ酸配列であり、8番めのバリンからはBO成熟体のN末端領域のアミノ酸を示していた。この配列中のリシン-アルギニンの配列はα因子のシグナルペプチドがプロセッシングを受ける部分であり、この部分でBOタンパクが切りだされ分泌されるものと予想される。プラスミドpBOGSαをXhoIとSphIで消化してアガロース電気泳動し、約2.2kbのDNA断片を確認し、この断片をGENE CLEAN II kitにより回収した。このDNA断片を、酵母-大腸菌のシャトルベクターであるpYES2をXhoIとSphIで消化したラージフラグメントと前述の如くライゲーションし、その反応液で大腸菌DH5αを前述の如くトランスフォーメーションした。得られ*

18

*た形質転換体より前述の如くプラスミドを回収しこれをpYES-BOとした。図3にpYES-BOのおおよその構造を示す。pYES2はXhoI、SphIサイトの upstream に酵母のGAL1遺伝子のプロモーターを持つプラスミドで、XhoIサイト側に遺伝子の upstream、SphIサイト側に遺伝子の downstream がくるような方向に遺伝子を挿入することで、遺伝子がGAL1プロモーターで転写されるようになる。すなわちここで取得されたプラスミドでは、挿入されたDNA断片がGAL1プロモーターで転写される構造を有していることになる。従って、このDNA断片がBOをコードしていれば、プラスミドを酵母に導入することでBOが発現することが期待できる。次に、前述のごとく得られたプラスミドpYES-BOを用いて酵母SHY2を形質転換した。形質転換の方法はLaboratory Course Manual for Methods In Yeast Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory)に記載されている方法にしたがって行なった。SHY2の性状は(α, ste-VC9, ura3-52, trp1-289, leu2-3, leu2-112, his3-1, can1-100)であり、この株はロイシンの存在しない培地では成育できない。この株がpYES2-BOを保持すればpYES-BOの持つロイシン合成遺伝子の働きによりロイシンが含まれていない培地でも成育できる、いわゆるロイシン非要求性の株となる。従って、pYES-BOによる形質転換体の酵母はロイシン非要求性となる。形質転換を行なった結果、5個の形質転換体を得られ、そのうちBO2株とした形質転換体酵母を以下の実験に供した。

②BO2株の培養

培養は次のようにして行なった。BO2株を下記組成のSDG培地10mlに接種して一晚30℃で前培養した。

0.67% bacto yeast nitrogen base
w/o amino acids

2 % ガラクトース
0.002% ウラシル
0.002% ヒスチジン
0.002% トリプトファン

前培養液0.5mlを100mlのSDG培地に接種して、30℃で一晩振とう培養しOD₆₁₀を経時的に測定した。OD₆₁₀が4.0に達した時点で培養をやめ、遠心分離(8000×g、10分)により菌体を取り除き、培養上清を回収して以下の実験に供した。またコントロールとしては、pYES2で形質転換されたSHY2(以下、コントロール株とする)に上記と同じ操作を行なって回収された培養上清を用いた。培養上清中に発現したBOが含まれているかを調べるために、まずBO※50

※2株とコントロール株の培養上清をそれぞれCentrifugal Ultrafree-20(分子量10,000カット、ミリポア社製)による限外濃縮により約50倍に濃縮した。また、回収した菌体は5mlの50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.0)-1mM PMSFに懸濁し、ボールミル破砕機(ビーブラウンテック製)により破砕した。破砕後懸濁液を遠心分離し上清を菌体内画分として使用した。次に、培養上清中のBO遺伝子の発現を調べるために、菌体内画分と培養上

清画分のBO活性の測定を行なった。BO活性の測定は以下のようにして行なった。0.1mg/mlのビリルビン(シグマ社製)を1mM EDTA-0.2M Tris・HCl(pH8.0)に溶解した溶液1mlとサンプル0.1mlを混合して、37℃で20分反応後、ブランクとの吸光度の差の有無により活性の存在を判定する。尚、各サンプルは、以下のようにして調製した。

サンプルA: BO2株の培養上清を濃縮(50倍)

サンプルB: BO2株の菌体を破碎後濃縮(20倍)

サンプルC: コントロール株の培養上清を濃縮(50倍)

サンプルD: コントロール株の菌体を破碎後濃縮(20倍)

BO活性があればビリルビンの吸光度のピークが減少するはずである。その結果を、図4及び図5に示した。培養上清を用いた実験では、コントロール株の培養上清を加えた場合、ビリルビンの吸光度のピークは減少しなかった。このとき、この上清にミロセシウム属由来のBO(天野製薬製)を加えると、ビリルビンのピークは著しく減少した。以上のことから、コントロール株の培養上清はBO活性を示すものを含んでいないし、カビBOの活性を完全に阻害するものも含んでいないことが明らかとなった。従って、SHY2に導入したDNA断片が発現して組み換えBOが分泌されていれば、その活性を検出できることになる。BO2株の培養上清を加えた実験では、図5から明らかなようにビリルビンの吸光度のピークが著しく減少した。すなわち、導入したDNA断片の存在に依存して培養上清にBO活性が検出できた。菌体内画分を用いた実験においても同様に導入したcDNAの存在に依存してBO活性が検出された。次にこのビリルビン分解活性が発現したBOによるものであることをウエスタンブロットを用いた解析により更に確認した。前述の如く調製されたコントロール株とBO2株の培養上清濃縮液をそれぞれSDS-PAGE電気泳動し*

た。SDS-PAGE電気泳動はMolecular Cloningに記載されている方法に準じて行なった。電気泳動後、ゲル上に分離されたタンパクバンドをPVDF膜(ミリポア社製)にMultiphor I(LKB社製)を用いて電気的にトランスファーした。その後このPVDF膜と抗BOウサギ血清を用いて、Amplified Alkaline Phosphatase Goat Anti-Rabbit Immun-Blot Assay Kit(バイオラッド社製)によりウエスタンブロットを行なった。ウエスタンブロットの方法はキットに添付されている説明書にしたがって行なった。その結果を図6に示した。レーン2にはカビ由来BOがアプライされており、約60kDaの位置にバンドが検出された。コントロール株の培養上清濃縮液を流したレーン4では60kDaの位置にはバンドは観察されなかった。この時BO2株の培養上清濃縮液を流したレーン3では図6より明らかなように60kDaの位置にバンドが観察された。したがって、遺伝子の存在に依存してBOと同じサイズのBOと同じ抗原性を有するバンドが観察されたことになる。このバンドは発現された組み換えBOに由来するものと考えられる。以上のことから導入されたDNA断片がBOタンパクをコードする遺伝子断片であると示唆され、得られた遺伝子断片がBOをコードするBO遺伝子であることが明らかとなった。

【発明の効果】本発明により、BOをコードする遺伝子が提供され、該遺伝子を組み込んだ形質転換体を培養することにBOを製造することができる。このようにして製造されたBOは、分析用酵素として利用され、産業上に大きく貢献できる。

【配列表】配列番号: 1

配列の長さ: 534

配列の型: アミノ酸

配列

Val Ala Gln Ile Ser Pro Gln Tyr Pro Met Phe Thr Val Pro Leu	15
Pro Ile Pro Pro Val Lys Gln Pro Arg Leu Thr Val Thr Asn Pro	30
Val Asn Gly Gln Glu Ile Trp Tyr Tyr Glu Val Glu Ile Lys Pro	45
Phe Thr His Gln Val Tyr Pro Asp Leu Gly Ser Ala Asp Leu Val	60
Gly Tyr Asp Gly Met Ser Pro Gly Pro Thr Phe Gln Val Pro Arg	75
Gly Val Glu Thr Val Val Arg Phe Ile Asn Asn Ala Glu Ala Pro	90
Asn Ser Val His Leu His Gly Ser Phe Ser Arg Ala Ala Phe Asp	105
Gly Trp Ala Glu Asp Ile Thr Glu Pro Gly Ser Phe Lys Asp Tyr	120
Tyr Tyr Pro Asn Arg Gln Ser Ala Arg Thr Leu Trp Tyr His Asp	135
His Ala Met His Ile Thr Ala Glu Asn Ala Tyr Arg Gly Gln Ala	150
Gly Leu Tyr Met Leu Thr Asp Pro Ala Glu Asp Ala Leu Asn Leu	165
Pro Ser Gly Tyr Gly Glu Phe Asp Ile Pro Met Ile Leu Thr Ser	180
Lys Gln Tyr Thr Ala Asn Gly Asn Leu Val Thr Thr Asn Gly Glu	195
Leu Asn Ser Phe Trp Gly Asp Val Ile His Val Asn Gly Gln Pro	210
Trp Pro Phe Lys Asn Val Glu Pro Arg Lys Tyr Arg Phe Arg Phe	225

2 1

2 2

Leu Asp Ala Ala Val Ser Arg Ser Phe Gly Leu Tyr Phe Ala Asp	240
Thr Asp Ala Ile Asp Thr Arg Leu Pro Phe Lys Val Ile Ala Ser	255
Asp Ser Gly Leu Leu Glu His Pro Ala Asp Thr Ser Leu Leu Tyr	270
Ile Ser Met Ala Glu Arg Tyr Glu Val Val Phe Asp Phe Ser Asp	285
Tyr Ala Gly Lys Thr Ile Glu Leu Arg Asn Leu Gly Gly Ser Ile	300
Gly Gly Ile Gly Thr Asp Thr Asp Tyr Asp Asn Thr Asp Lys Val	315
Met Arg Phe Val Val Ala Asp Asp Thr Thr Gln Pro Asp Thr Ser	330
Val Val Pro Ala Asn Leu Arg Asp Val Pro Phe Pro Ser Pro Thr	345
Thr Asn Thr Pro Arg Gln Phe Arg Phe Gly Arg Thr Gly Pro Thr	360
Trp Thr Ile Asn Gly Val Ala Phe Ala Asp Val Gln Asn Arg Leu	375
Leu Ala Asn Val Pro Val Gly Thr Val Glu Arg Trp Glu Leu Ile	390
Asn Ala Gly Asn Gly Trp Thr His Pro Ile His Ile His Leu Val	405
Asp Phe Lys Val Ile Ser Arg Thr Ser Gly Asn Asn Ala Arg Thr	420
Val Met Pro Tyr Glu Ser Gly Leu Lys Asp Val Val Trp Leu Gly	435
Arg Arg Glu Thr Val Val Val Glu Ala His Tyr Ala Pro Phe Pro	450
Gly Val Tyr Met Phe His Cys His Asn Leu Ile His Glu Asp His	465
Asp Met Met Ala Ala Phe Asn Ala Thr Val Leu Pro Asp Tyr Gly	480
Tyr Asn Ala Thr Val Phe Val Asp Pro Met Glu Glu Leu Trp Gln	495
Ala Arg Pro Tyr Glu Leu Gly Glu Phe Gln Ala Gln Ser Gly Gln	510
Phe Ser Val Gln Ala Val Thr Glu Arg Ile Gln Thr Met Ala Glu	525
Tyr Arg Pro Tyr Ala Ala Ala Asp Glu	534

配列番号 : 2

* 配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 2 5

*

配列

Val Ala Gln Ile Ser Pro Gln Tyr Pro Met Phe Thr Val Pro Leu	15
Pro Ile Pro Pro Val Lys Gln Pro Arg Leu	25

配列番号 : 3

※配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 1 2

※

配列

Ile Gln Thr Met Ala Glu Tyr Arg Pro Tyr Ala Ala	12
---	----

配列番号 : 4

★配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 7

★

配列

Asp Tyr Tyr Tyr Pro Asn Arg	7
-----------------------------	---

配列番号 : 5

☆配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 8

☆

配列

Val Pro Phe Pro Ser Pro Thr Thr	8
---------------------------------	---

配列番号 : 6

◆配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 1 7

◆40

配列

Leu Thr Val Thr Asn Pro Val Asn Gly Gln Glu Ile Trp Tyr Tyr	15
Glu Val	17

配列番号 : 7

* 配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 9

*

配列

Tyr Arg Pro Tyr Ala Ala Ala Asp Glu	9
-------------------------------------	---

配列番号 : 8

※配列の型 : アミノ酸

配列の長さ : 1 0

※

配列

(13)

特開平5-199882

23

24

Phe Ser Asp Tyr Ala Gly Lys Thr Ile Glu

10

配列番号: 9

* 配列の型: アミノ酸

配列の長さ: 8

*

配列

Leu Trp Gln Ala Arg Pro Tyr Glu

8

配列番号: 10

※配列の型: アミノ酸

配列の長さ: 15

※

配列

Phe Gln Ala Gln Ser Gly Gln Phe Ser Val Gln Ala Val Thr Glu

15

配列番号: 11

10★配列の型: アミノ酸

配列の長さ: 10

★

配列

Thr Leu Trp Tyr His Asp His Ala Met His

10

配列番号: 12

☆配列の型: アミノ酸

配列の長さ: 28

☆

配列

Asn Ala Tyr Arg Gly Gln Ala Gly Leu Tyr Met Leu Thr Asp Pro

15

Ala Glu Asp Ala Leu Asn Leu Pro Ser Gly Tyr Gly Glu

28

配列番号: 13

◆配列の型: 核酸

配列の長さ: 1959

◆20

配列

ACCAGACAAA CTTGAGCTTG CTTGACTCGG AGTCCTTTAG TTTTGCCTTT CATTTACAGT

60

CCAAG ATG TTC AAA CAC ACA CTT GGA GCT GCT GCC CTC AGC TTG CTT

107

Met Phe Lys His Thr Leu Gly Ala Ala Ala Leu Ser Leu Leu

-38

-35

-30

-25

TTC AAC AGC AAT GCT GTC CAG GCA AGC CCC GTC CCC GAG ACC TCA CCG

155

Phe Asn Ser Asn Ala Val Gln Ala Ser Pro Val Pro Glu Thr Ser Pro

-20

-15

-10

GCA ACT GGA CAT CTC TTC AAG CGA GTT GCC CAG ATC AGC CCA CAG TAT

203

Ala Thr Gly His Leu Phe Lys Arg Val Ala Gln Ile Ser Pro Gln Tyr

-5

1

5

CCC ATG TTC ACA GTA CCA CTG CCA ATT CCT CCT GTT AAG CAG CCC CGC

251

Pro Met Phe Thr Val Pro Leu Pro Ile Pro Pro Val Lys Gln Pro Arg

10

15

20

TTG ACT GTA ACC AAT CCT GTG AAT GGA CAA GAG ATC TGG TAC TAT GAG

299

Leu Thr Val Thr Asn Pro Val Asn Gly Gln Glu Ile Trp Tyr Tyr Glu

25

30

35

40

GTC GAG ATC AAG CCC TTC ACT CAC CAG GTT TAC CCT GAC CTT GGA TCC

347

Val Glu Ile Lys Pro Phe Thr His Gln Val Tyr Pro Asp Leu Gly Ser

45

50

55

GCT GAT CTG GTC GGG TAT GAT GGA ATG TCT CCT GGC CCT ACT TTC CAG

395

Ala Asp Leu Val Gly Tyr Asp Gly Met Ser Pro Gly Pro Thr Phe Gln

60

65

70

GTT CCT CGT GGA GTT GAA ACA GTT GTC CGC TTC ATT AAC AAT GCT GAG

443

Val Pro Arg Gly Val Glu Thr Val Val Arg Phe Ile Asn Asn Ala Glu

75

80

85

GCT CCT AAC TCC GTT CAC CTG CAC GGA TCA TTC TCT CGT GCC GCC TTT

491

Ala Pro Asn Ser Val His Leu His Gly Ser Phe Ser Arg Ala Ala Phe

2 5															95															100														
90																																												
GAC	GGA	TGG	GCA	GAG	GAC	ATC	ACC	GAG	CCT	GGC	AGC	TTC	AAA	GAC	TAT	539																												
Asp	Gly	Trp	Ala	Glu	Asp	Ile	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	Phe	Lys	Asp	Tyr																													
105					110					115					120																													
TAC	TAC	CCA	AAT	AGA	CAG	TCT	GCT	CGT	ACC	CTA	TGG	TAC	CAC	GAT	CAT	587																												
Tyr	Tyr	Pro	Asn	Arg	Gln	Ser	Ala	Arg	Thr	Leu	Trp	Tyr	His	Asp	His																													
125					130					135																																		
GCT	ATG	CAT	ATC	ACT	GCT	GAG	AAC	GCC	TAC	CGT	GGC	CAG	GCT	GGT	CTC	635																												
Ala	Met	His	Ile	Thr	Ala	Glu	Asn	Ala	Tyr	Arg	Gly	Gln	Ala	Gly	Leu																													
140					145					150																																		
TAC	ATG	CTC	ACT	GAC	CCA	GCC	GAA	GAC	GCT	CTC	AAC	TTG	CCA	AGT	GGA	683																												
Tyr	Met	Leu	Thr	Asp	Pro	Ala	Glu	Asp	Ala	Leu	Asn	Leu	Pro	Ser	Gly																													
155					160					165																																		
TAT	GGC	GAG	TTC	GAT	ATT	CCA	ATG	ATC	CTC	AAG	TCC	AAG	CAA	TAT	ACC	731																												
Tyr	Gly	Glu	Phe	Asp	Ile	Pro	Met	Ile	Leu	Thr	Ser	Lys	Gln	Tyr	Thr																													
170					175					180																																		
GCA	AAC	GGC	AAC	TTG	GTC	ACC	ACT	AAT	GGA	GAG	CTG	AAC	TCA	TTC	TGG	779																												
Ala	Asn	Gly	Asn	Leu	Val	Thr	Thr	Asn	Gly	Glu	Leu	Asn	Ser	Phe	Trp																													
185					190					195					200																													
GGT	GAT	GTA	ATT	CAC	GTG	AAC	GGT	CAA	CCC	TGG	CCT	TTC	AAG	AAC	GTT	827																												
Gly	Asp	Val	Ile	His	Val	Asn	Gly	Gln	Pro	Trp	Pro	Phe	Lys	Asn	Val																													
205					210					215																																		
GAG	CCT	CGC	AAA	TAT	CGA	TTC	CGC	TTC	CTC	GAT	GCC	GCA	GTT	TCT	CGC	875																												
Glu	Pro	Arg	Lys	Tyr	Arg	Phe	Arg	Phe	Leu	Asp	Ala	Ala	Val	Ser	Arg																													
220					225					230																																		
TCT	TTC	GGC	CTT	TAC	TTT	GCT	GAT	ACT	GAT	GCT	ATC	GAC	ACT	CGC	TTG	923																												
Ser	Phe	Gly	Leu	Tyr	Phe	Ala	Asp	Thr	Asp	Ala	Ile	Asp	Thr	Arg	Leu																													
235					240					245																																		
CCT	TTC	AAG	GTT	ATT	GCC	TCC	GAT	TCT	GGT	CTT	CTT	GAA	CAC	CCT	GCC	971																												
Pro	Phe	Lys	Val	Ile	Ala	Ser	Asp	Ser	Gly	Leu	Leu	Glu	His	Pro	Ala																													
250					255					260																																		
GAT	ACC	AGC	TTG	CTG	TAC	ATT	TCC	ATG	GCC	GAG	CGT	TAC	GAA	GTT	GTG	1019																												
Asp	Thr	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ile	Ser	Met	Ala	Glu	Arg	Tyr	Glu	Val	Val																													
265					270					275					280																													
TTT	GAC	TTC	TCC	GAC	TAT	GCT	GGC	AAG	ACT	ATT	GAA	CTC	CGC	AAC	CTG	1067																												
Phe	Asp	Phe	Ser	Asp	Tyr	Ala	Gly	Lys	Thr	Ile	Glu	Leu	Arg	Asn	Leu																													
285					290					295																																		
GGC	GGT	AGC	ATT	GGC	GGC	ATC	GGA	ACA	GAT	ACC	GAC	TAT	GAC	AAC	ACC	1115																												
Gly	Gly	Ser	Ile	Gly	Gly	Ile	Gly	Thr	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asp	Asn	Thr																													
300					305					310																																		
GAC	AAG	GTC	ATG	CGT	TTC	GTG	GTA	GCA	GAC	GAC	ACA	ACT	CAG	CCA	GAT	1163																												
Asp	Lys	Val	Met	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Asp	Asp	Thr	Thr	Gln	Pro	Asp																													
315					320					325																																		
ACC	TCA	GTT	GTT	CCT	GCT	AAC	CTT	CGT	GAT	GTT	CCC	TTC	CCC	TCT																														

27	Trp Thr Ile Asn Gly Val Ala Phe Ala Asp Val Gln Asn Arg Leu Leu	28
	365 370 375	
	GCA AAC GTA CCC GTT GGT ACT GTC GAG CGT TGG GAG CTC ATC AAC GCC	1355
	Ala Asn Val Pro Val Gly Thr Val Glu Arg Trp Glu Leu Ile Asn Ala	
	380 385 390	
	GGT AAC GGT TGG ACG CAC CCT ATT CAC ATC CAT CTT GTC GAC TTC AAG	1403
	Gly Asn Gly Trp Thr His Pro Ile His Ile His Leu Val Asp Phe Lys	
	395 400 405	
	GTG ATT TCT CGT ACT TCC GGC AAC AAC GCG CGC ACA GTC ATG CCA TAC	1451
	Val Ile Ser Arg Thr Ser Gly Asn Asn Ala Arg Thr Val Met Pro Tyr	
	410 415 420	
	GAG TCC GGT CTC AAA GAC GTT GTC TGG CTT GGT CGC CGT GAA ACT GTG	1499
	Glu Ser Gly Leu Lys Asp Val Val Trp Leu Gly Arg Arg Glu Thr Val	
	425 430 435 440	
	GTT GTT GAG GCT CAT TAC GCG CCT TTC CCT GGT GTA TAC ATG TTC CAT	1547
	Val Val Glu Ala His Tyr Ala Pro Phe Pro Gly Val Tyr Met Phe His	
	445 450 455	
	TGC CAC AAT TTG ATT CAC GAG GAT CAC GAT ATG ATG GCT GCC TTT AAC	1595
	Cys His Asn Leu Ile His Glu Asp His Asp Met Met Ala Ala Phe Asn	
	460 465 470	
	GCC ACC GTC CTG CCA GAT TAT GGC TAT AAT GCC ACT GTT TTC GTT GAC	1643
	Ala Thr Val Leu Pro Asp Tyr Gly Tyr Asn Ala Thr Val Phe Val Asp	
	475 480 485	
	CCT ATG GAA GAG CTT TGG CAG GCT CGT CCT TAT GAA CTC GGC GAG TTC	1691
	Pro Met Glu Glu Leu Trp Gln Ala Arg Pro Tyr Glu Leu Gly Glu Phe	
	490 495 500	
	CAG GCT CAG AGT GGC CAG TTC AGC GTT CAG GCT GTT ACT GAG CGT ATT	1739
	Gln Ala Gln Ser Gly Gln Phe Ser Val Gln Ala Val Thr Glu Arg Ile	
	505 510 515 520	
	CAG ACT ATG GCT GAA TAC AGA CCT TAC GCC GCA GCT GAC GAG	1781
	Gln Thr Met Ala Glu Tyr Arg Pro Tyr Ala Ala Ala Asp Glu	

525

330

534

TAGAAACATA CCAGGTATGG TATTGATGAA GGAAGCCAGG AAATCTCATG AATAACTTGT 1841

ATCTATTCCA TTCGTGCTAC ACCATATAGG CCATGACCTG CAGCTAGACT GTTAGGCTGA 1901

GCATCACTTT TTACCGCTGA TATGGAGACT ACATTTGAAG GAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1959

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpUCBO-A、プラスミドpUCBO-B、プラスミドpUCBO-C及びプラスミドpUC-BOの制限酵素地図を示す。

【図2】ノザンプロテイングのパターンを示す。

【図3】プラスミドpYES-BOのおおよその構造を示す。

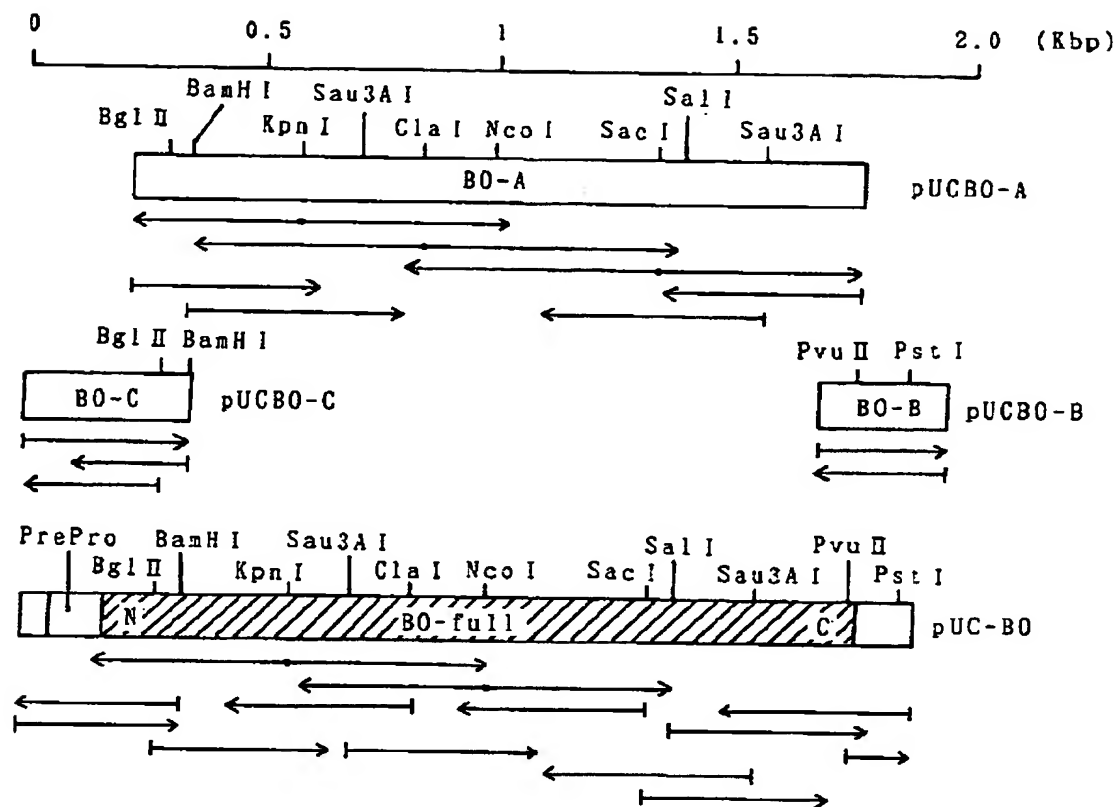
【図4】BO2株及びコントロール株の培養上清中のBO活性の測定結果を示す。図中で①はビリルビン、②はビリルビン+サンプルCを、③はビリルビン+サンプル*

*C+ビリルビンオキシダーゼを、④はビリルビン+サンプルAの結果を示す。

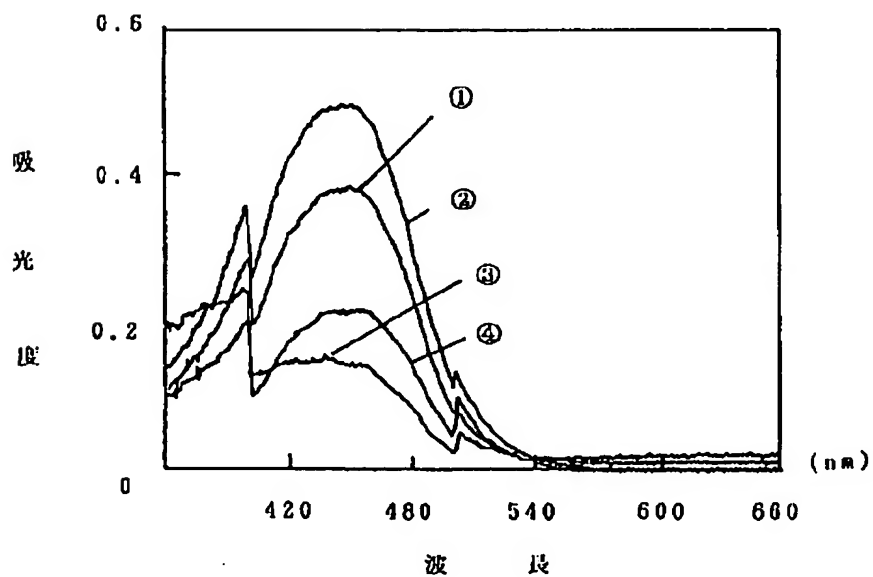
【図5】BO2株及びコントロール株の菌体中のBO活性の測定結果を示す。図中で①はビリルビン、②はビリルビン+サンプルDを、③はビリルビン+サンプルD+ビリルビンオキシダーゼを、④はビリルビン+サンプルBの結果を示す。

【図6】BO2株及びコントロール株の培養上清濃縮液によるウエスタンブロットの結果を示す。

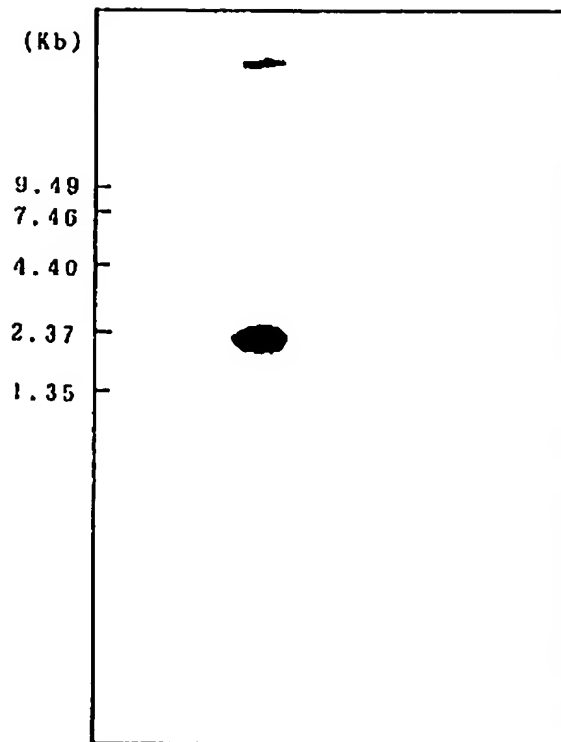
【図1】



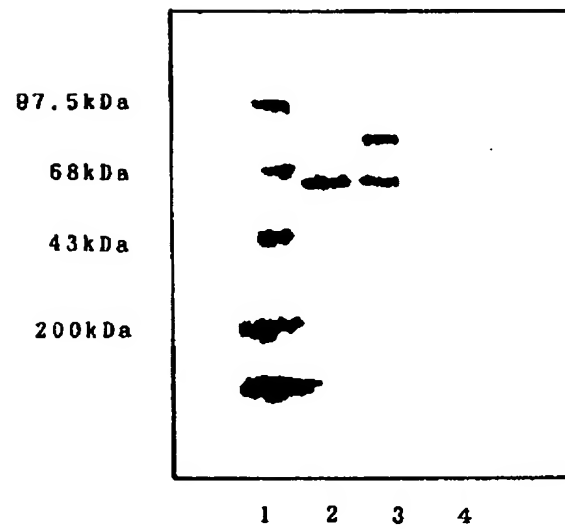
【図4】



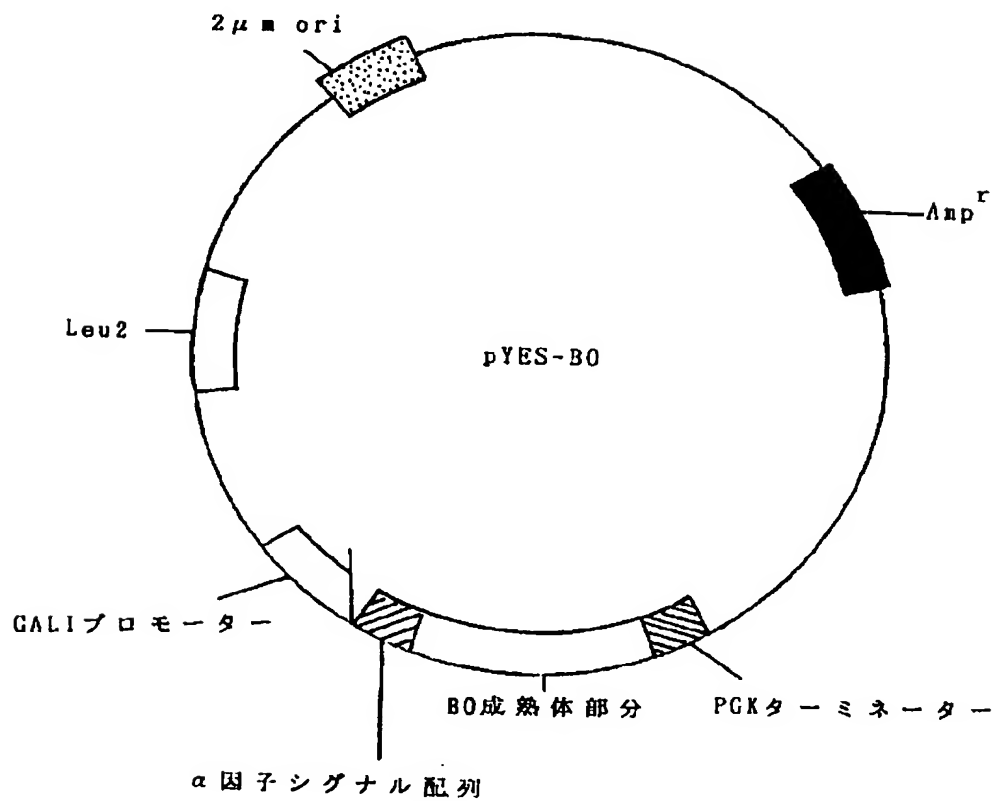
【図2】



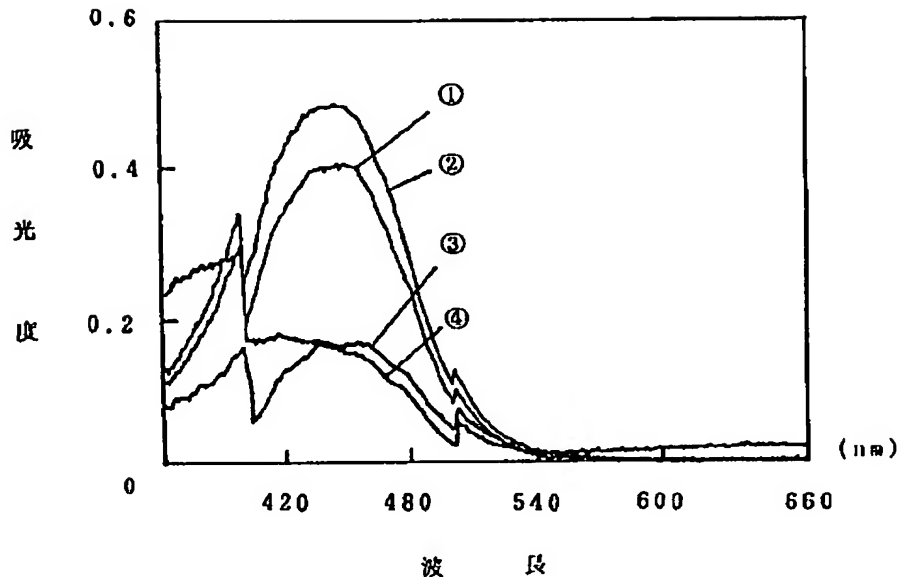
【図6】



【図3】



【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成5年1月13日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】ビリルビンオキシダーゼの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】ビリルビンオキシダーゼの遺伝情報を担うDNA。

【請求項2】配列番号：1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項3】ビリルビンオキシダーゼをコードする塩基配列を複製可能な発現ベクターに連結し、該塩基配列と複製可能な発現ベクターとを含有する複製可能な組換えDNA。

【請求項4】ビリルビンオキシダーゼをコードする塩基配列を複製可能な発現ベクターに連結し、該塩基配列と複製可能な発現ベクターとを含有する複製可能な組換えDNAを得、該組換えDNAで微生物を形質転換した形質転換体。

【請求項5】ビリルビンオキシダーゼの遺伝情報を担うDNAをベクターに組み込んだ組換えDNAを微生物に導入し、該微生物を培養し、ビリルビンオキシダーゼを培養物中に産生せしめ、該培養物中よりビリルビンオキシダーゼを採取することを特徴とするビリルビンオキシ

ダーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ビリルビンオキシダーゼ（以下、BOという）をコードする遺伝子および該遺伝子を組み込んだ組換えDNA、該組換えDNAを導入した形質転換体及び該形質転換体を培養することによるBOの製造法に関し、該BOは分析用酵素として利用され、産業上特に重要である。

【0002】

【従来の技術】BOは国際生化学連合（I.U.B）酵素委員会により、酵素番号EC 1.3.3.5として分類される酵素である。BOはミロセシウム（*Myrothecium*）属、トリコデルマ（*Trichoderma*）属及びコプリナス（*Coprinas*）属等の微生物が産生することが報告されている酵素であり、ビリルビンに作用してビリベルジンを経てほぼ無色の生成物に変化せしめる反応を触媒する酵素である。その結果、ビリルビンの特異吸収（460nm付近）が減少するとともに、その還元性が消失する。また、この酵素は過酸化水素を生成しない特徴を有している。BOはその起源にもよるが、約52,000～約83,000の分子量を有している。特にミロセシウム属菌由来のBOはその酵素的性質も詳細に明らかにされている（特公昭60-12032号）。

【0003】このようにBOはビリルビンに作用してビリルビンを分解する酵素であることから、特に体液中のビリルビン定量用診断薬として応用され、肝疾患等の診断

に利用されている。更に血清中ビリルビンによる測定干渉作用を除去するためにビリルビンの消去用として各種の生化学検査用試薬に利用されている。その他、B0は各種の方面(例えば、医薬、洗剤など)にも応用が図られている。

【0004】B0は前記に述べたようにミロセシウム属、トリコデルマ属及びコプリナス属等の微生物から生産されているが、現在ではB0遺伝子についての解析は全くなされていないのである。また、組換え体B0の製造に関する研究も従来では全くなされていないのが現状である。よって、遺伝子操作によりこれらのB0を大量に、安価に生産する方法の開発が要望されていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従来、B0は前述したような微生物を培養することによって製造されているため、供給量、供給費用などの点で改善すべき点が多かった。

【0006】本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意研究の結果、B0をコードするDNAを精製・単離し、その塩基配列を決定することに成功した。更に該遺伝子を組み込んだ形質転換体を得、該形質転換体を培養することによってB0を製造する方法を完成した。

【0007】かかる成果に基づいてB0の効率的な大量生産への途を開き、さらには、蛋白質工学によるB0の特異性の改変への途をも開いた。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、B0遺伝子をコードするDNAに関するものであり、更に該遺伝子を組み込んだ形質転換体を培養することによるB0の製造方法に関する。

【0009】即ち、配列番号：1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを提供するものである。かかるDNAは、遺伝コドンの縮重を考慮すると、種々の塩基配列を包含し得る。

【0010】これらの塩基配列は、遺伝子発現系の諸要素、例えば宿主細胞の種類等に応じた優先コドン等によって当業者が容易に選択し得るものである。

【0011】配列番号：1に示したDNAの取得方法も化学的合成法も含めて種々のものが考えられる。例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法により得られたDNA断片をプローブとして用い、ゲノムDNA等からイントロンを含む遺伝子をクローニングした後、イントロンを含まないcDNAを、例えばPCR法により得ることができる。

【0012】これらの遺伝子はB0を生産する微生物より以下の実施例に述べる方法により単離できる。微生物としては、B0を産生するものであればいずれでも良いが、例えばミロセシウム属、トリコデルマ属及びコプリナス属等の微生物が使用できる。好ましくはミロセシウム属が挙げられ、より好ましくは、ミロセシウム・ベルカリア (*Myrothecium verrucaria*) MT-1 (本菌株は工業

技術院微生物工業技術研究所に寄託されその寄託番号は微工研条第653号である。)が使用できる。

【0013】以下、本発明をミロセシウム・ベルカリア MT-1 由来のB0の場合を例にとり、実施例を参照しながら詳細に説明する。

【0014】尚、トリコデルマ属及びコプリナス属等の微生物から生産されているB0の場合についても、本発明と同様の過程を踏み、プライマー等を適当にデザインすることによって容易に実施できる。よって、本発明は以下に記載する実施例に限定されるものではない。

【0015】

【実施例】

実施例1 B0のcDNAクローニング

①菌体の取得

まずB0を分泌発現する生産菌を以下の如く培養した。培養の為に培地には以下に示すポテトグルコース培地を使用した。

【0016】ポテトグルコース培地の作製法

1 馬鈴薯の皮及び芽をとり約1cmの角切りにしたのち、400gを上皿天秤で秤量してステンレスバットに入れる。

2 脱イオン水1000mlをメスシリンダーで量り、上記のステンレスバットに加え、アデカノールLG-126 (旭電化工業製)を3滴添加する。

3 ガスコンロではじめ強火で煮沸させ、その後は弱火で2時間煮沸する。その後、流水中で冷却する。

4 冷却後、ガーゼ2枚でろ過する。

5 ろ液を1000mlに脱イオン水でフィルアップし、グルコースを10g加えて溶解する。

6 121℃で、30分間オートクレーブする。

【0017】上記の如く作製されたポテトグルコース培地2mlに、孢子形成を行っていないミロセシウム・ベルカリアMT-1 (以下、B0生産菌という。)を接種して140rpmで30℃、3日間振盪培養した。次にこの培養液2mlを同ポテトグルコース培地100mlに接種し、140rpmで30℃、3日間振盪培養した。更に、この培養液2mlを500mlの同ポテトグルコース培地の入った坂口フラスコに接種して、125rpm、25℃で振盪培養した。培養の間、培養液を経時的にサンプリングして、その上清に含まれるB0の発現量の変動を、下記に示す測定法によりB0活性を測定し、B0活性が高い培養液を回収した。

【0018】B0活性測定法

エチレンジアミン四酢酸1mMを含む0.2M-トリス塩酸緩衝液250mlに試薬ビリルビン (和光純薬工業製) 5mgを溶解し、この2mlと酵素液0.2mlを37℃で反応させ440nmの吸光度の減少を測定する。

【0019】この培養液から菌体を遠心分離 (12000×g, 15分) により菌体を回収し、-80℃に凍結保存して以下の実験に供した。

【0020】②菌体から全RNAの調製法

全RNAは、グアニジウム／塩化セシウム法〔[バイオケミストリ (Biochemistry), 13, 2633 (1974)]、[サイエンス (Science), 196, 1313 (1977)]、[モレキュラー クローニング (Molecular Cloning) (1982)]〕に従って調製した。

【0021】①で得られた菌体10gと海砂(20~35メッシュ、和光純薬製)5gを混合し、すり鉢の中で液体窒素と共に菌体を粉砕した。得られた粉砕物を40mMの4 M グアニジンチオシアネート(フルカ製)、200mM 酢酸ナトリウム(和光純薬製)、5mM EDTA(ドウジン製)を含む溶液に加え、室温で15分間振盪混合させた。

【0022】得られた混合物を30mlのコーニングチューブに分配し、遠心分離(10,000rpm、15分)を行なった。次に予め4mlの5 M 塩化セシウム(和光純薬製)の入った遠心チューブ6本に、得られた上清を6mlずつ重層し、超遠心分離(37,000rpm、18時間)を行なった。その結果、チューブの底に透明な沈殿物を得た。

【0023】この沈殿物を80%エタノールで2回洗浄し乾燥させ、1チューブあたり80 μ lの10mM トリス・塩酸緩衝液(pH7.6)、10mM EDTA、0.5% SDSを含む溶液に溶かした。次に6本分を1本のチューブに集め、10mM トリス・塩酸緩衝液(pH8.0)(1mMのEDTA含有)(以下、TEという)、飽和フェノール及びクロロホルムで2回ずつ抽出し、最後に得られた水層に1/10容量の3 M 酢酸ナトリウム(pH5.2)溶液と2倍容量のエタノールを加え、-20℃に1時間おいた。その後、遠心分離(12,000 \times g、15分)により沈殿を回収し、沈殿を80%エタノールで洗浄し、乾燥させた。これを滅菌蒸留水200 μ lに溶かし以下の実験に使用した。尚、最終的に得られた全RNA量は約2mgであった。

【0024】③全RNAからpoly(A)⁺RNAの調製法

②で得られた全RNA 1.2mgからmRNA Purification Kit(ファルマシア社製)を用いてpoly(A)⁺RNAを12 μ g回収した。

【0025】④B0蛋白のアミノ末端部分の配列とB0蛋白をプロテアーゼで切断したペプチドのアミノ酸配列の決定

(I) B0蛋白のアミノ末端部分のアミノ酸配列の決定

(i) B0蛋白の還元カルボキシメチル化

ミロセシウム・ベルカリアMT-1由来の精製したB0蛋白5mgを3mlの6 M グアニジン塩酸と2mM EDTAを含む0.5M トリス・塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解し、50℃で2分間処理した後、室温で2時間放置した。放置しておいた反応液に0.6mgのDTT(ジチオスレイトール)と1.5mgのヨード酢酸を加え暗所で30分反応させた後、透析チューブに移し、暗所でイオン交換水に透析した。得られた透析内液を凍結乾燥し、以下の実験に用いた。

【0026】(ii) アミノ酸配列の決定

(i) で得られた試料の適当量を液相法プロテインシークエンサー(アプライド・バイオシステム社製)あるいは

は固相法プロテインシークエンサー(ミリジェン・バイオサーチ社製)にかけ、得られたデータからアミノ酸配列(配列番号: 2)を決定した。

【0027】(II) B0蛋白をプロテアーゼで切断したペプチドのアミノ酸配列の決定

(i) トリプシン分解断片の取得とアミノ酸配列の決定

(I) の(i)で示したようにB0蛋白を還元カルボキシメチル化した試料を5mMの炭酸水素アンモニウム(pH7.9)に溶解し、TPCK-トリプシン(ペーリンガー・マンハイム製)をB0蛋白量の1/50モル量加え、37℃で6時間処理し、さらに同量のTPCK-トリプシンを加え37℃で24時間処理した反応液を塩酸でpH2に調整した。トリプシン分解断片は、得られたトリプシン分解反応液の適当量をHPLC逆相クロマトグラフィー(μ Bondasphere C18-100Aカラム)を行なうことにより分画し取得した。

尚、HPLCの条件は下記の通りである。

【0028】A液: 0.5%トリフルオロ酢酸/水

B液: 0.5%トリフルオロ酢酸/50%アセトニトリル/水

グラジェント: 0-100%B液のリニアグラジェント

流速: 0.5ml/分

【0029】分画し得られたトリプシン分解断片の内、(I)の(ii)と同様のプロテインシークエンサーを用いて4種類の断片のアミノ酸配列(配列番号: 3~配列番号: 6)を決定した。

【0030】(ii) V8プロテアーゼ分解断片の取得とアミノ酸配列の決定

(I)の(i)で示したようにB0蛋白を還元カルボキシメチル化した試料を5mMの炭酸水素アンモニウム(pH7.9)に溶解し、V8プロテアーゼ(Staphylococcus aureus由来: ペーリンガー・マンハイム製)をB0蛋白量の1/50モル量加え37℃で6時間処理し、さらに同量のV8プロテアーゼを加え37℃で24時間処理した反応液を塩酸でpH2に調整した。V8プロテアーゼ分解断片は、得られた分解反応液の適当量を、トリプシン分解の場合と同様にHPLC逆相クロマトグラフィーを行なうことにより分画し取得した。尚、分画条件も同様である。

【0031】分画し得られたV8プロテアーゼ分解断片の内、(I)の(ii)と同様のプロテインシークエンサーを用いて6種類の断片のアミノ酸配列(配列番号: 7~配列番号: 12)を決定した。

【0032】⑤PCR(Polymerase Chain Reaction)法によるDNA断片の取得

B0のcDNAを含む特定のDNA領域を、最近開発されてきたPCR法〔[サイエンス (Science), 230, 1350 (1985)]、メソッド イン エンザイモロジー(Method in Enzymology), 155, 335 (1987)]〕によって、単離増幅した。

【0033】(I) B0蛋白の一部に対応するDNA断片の取得

(i) PCR法に用いたプライマーDNAの合成

④の(I)で決定されたB0蛋白のアミノ末端配列(配列番号: 2)の16番目のプロリンから22番目のグルタミンに対応する塩基配列を予想し、DNAを合成した。尚、5'側には、PCR産物であるDNA断片をサブクロニングし易くするために、制限酵素EcoRIの認識配列を加えてあ

A A
プライマー#1 5' -GGGAATTCNATTCCTCCIGTAA CA- 3' (N=A, G, C, T)
C G (I:イノシン)

【0035】次に④の(II)で得られたB0蛋白をトリプシンで分解した断片のうち、1つの断片のアミノ酸配列(配列番号: 3)に対応する塩基配列を予想してDNAを合成した。尚、5'側には、PCR産物のDNA断片をサブクロニングし易くするために制限酵素BamHIの認識配列を

A A A GA T
プライマー#2 5' -CGGGATCC TC TCIGC TAIGGIC TA TC- 3'
G G G TG C (I:イノシン)

【0037】合成したDNAはそれぞれ200 μ lのTEに溶解し、PCR法のプライマーとして使用した。

【0038】(ii) PCR法に用いた鋳型DNAの調製
②で得られた全RNA10 μ l (0.5 μ g)と20 μ MのOligomer(dT)₁₅ (ベーリンガー製) 3 μ lを500 μ l容量のチューブ内で混合し、70°Cで10分間インキュベートした

[5 \times] reverse buffer (BRL製)	4 μ l
0.1M DTT (BRL製)	2 μ l
RNasin (20units) (Promega製)	1.5 μ l
2.5mM NTPs (TOYOBO製)	8 μ l
MMTV Reverse Transcriptase (200units) (BRL製)	1 μ l

【0041】(iii) PCR法によるDNA断片の増幅
反応は、Gene Amp™ Kit (パーキンエルマージャパン社製)を用い、同社のDNA Thermal Cycler (DNA増幅装

H ₂ O	58.5 μ l
[10 \times] Reaction Buffer	10 μ l
dNTPs, mix 1.25mM	16 μ l
プライマー#1	5 μ l
プライマー#2	5 μ l
1st DNA mix	5 μ l
AmpliTaQ™ DNA polymerase (5units/ μ l)	0.5 μ l

【0043】上記の反応液100 μ lを混合し、ミネラルオイル(シグマ社製)100 μ lを加えた。次に反応液の入ったチューブをDNA Thermal Cyclerにセットし、以下の条件で反応を行なった。

【0044】95°C 0.5分
37°C 0.5分
72°C 3分

【0045】この条件下で反応を40サイクル行なった後、更に72°Cで7分間インキュベートした。

【0046】(iv) 増幅されたDNAの回収
反応後、ミネラルオイルを除き、100 μ lのクロロホルムを加え混合し、遠心分離(15,000rpm、2分)を行な

る。以下に示す全てのDNA合成には、0.2 μ MスケールでサイクロプラスDNA合成機(ミリジェン・バイオサーチ社製)を使用した。このDNAをPCR法のプライマー#1とした。プライマー#1の配列を以下に示す。

【0034】

加えてある。配列番号: 3の6番目のグルタミン酸から12番目のアラニンに対応するDNAの相補的配列をPCR法のプライマー#2とした。プライマー#2の配列を以下に示す。

【0036】

後、すぐに氷中で冷やした。

【0039】次に、この得られた混合物4 μ lに対し以下の試薬を混合し、37°Cで45分間インキュベートした。この反応物をPCR法の鋳型DNAとした。以下、この反応物を1st DNA mixという。

【0040】

置)により行なった。反応溶液の組成は以下の通りである。

【0042】

い、上清を100 μ l回収した。このうち10 μ lを用いて1%アガロース電気泳動で回収されたDNAのサイズと量を確認した。その結果約1.5KbpのDNA断片が約2 μ g増幅されていることがわかった。

【0047】残りの90 μ lを1%アガロース電気泳動にかけ、1.5Kbpに相当するバンドを切りだし、DNA精製キット(BIO 101社製)、GENECLEAN IIでこのDNAを抽出した。この操作で約1 μ gのDNA断片が回収された。以下、このDNA断片をB0-Aという。

【0048】(v) PCR法で増幅されたDNAの塩基配列の決定
まず、(iv)で得られたB0-Aを制限酵素EcoRI、あるいは

はBamHIで切断し、1%アガロース電気泳動でサイズを確認した。このBO-AはBamHIで切断されることがわかった。したがって、制限酵素処理しないBO-Aと、適当量をあらかじめ制限酵素SmaIで切断した市販のプラスミドpUC19 (TOYOBO製) [ジーン (Gene), 33, 103 (1985)] と混合し、ライゲーションキット (宝酒造製) を用いて16°C、18時間連結反応を行なった。

【0049】次にこの混合物で大腸菌DH5 α を形質転換した [ジャーナル オブ モレキュラー バイオロジー (J. Mol. Biol.), 166, 577 (1983)]。得られた形質転換体より、プラスミドを調製し、pUC19にBO-Aが導入されたプラスミドpUCBO-Aを得た。

【0050】次に、塩基配列決定のための方向を調べるために、各種制限酵素でpUCBO-Aを切断し、BO-Aの制限酵素地図を作製した。図1の上段のスケールはDNA断片のサイズを示し、枠で仕切られたBO-Aの上部に、制限酵素認識部位を示し (例えば BglIII、BamHI等)、枠の右端にBO-Aを含むプラスミド名としてpUCBO-Aを示した。

【0051】次に、塩基配列決定のためのサブクローニングを、得られたBO-Aの制限酵素地図を基に行なった。塩基配列決定の鋳型DNAは、M13ファージ (M13mp18, M13mp19) のRF DNAにDNA断片をクローニングし、一本鎖DNAとして回収したり [メソッド イン エンザイモロジー, 101, 20 (1983)]、pUC18、pUC19やpHSG396、pHSG397 (いずれも宝酒造製) のプラスミドにクローニングし、二本鎖DNAとして回収し、鋳型DNAとした。塩基配列は、得られた鋳型DNAを [α -³²P] dCTPと7-Deaza-S

プライマー#3 5' -TCGAATTCAGGCTCAGAGTGGCCAGTTCAGCG- 3'

【0056】もう一方のプライマーは、poly(A)+RNAの3'側のpoly(A)配列を利用したPCR法を行なうために、3つの制限酵素認識部位 (5'からClaI、HindIII、SalI) のみを持つDNAを合成し、このDNAをPCR法のプライマー#4とした。プライマー#4の配列を以下に示す。

【0057】

プライマー#4 5' -GATCGATAAGCTTGTGCGACT- 3'

【0058】合成したDNAはそれぞれ200 μ lのTEに溶解し、PCR法のプライマーとして使用した。

【0059】(ii) PCR法に用いた鋳型DNAの調製
まず、(I)の(ii)で使用したOligomer(dT)₁₅に代えて、5'側にさらにプライマー#4の配列をもつDNAを合

(5 \times) reverse buffer (BRL製)	4 μ l
0.1M DTT (BRL製)	2 μ l
RNasin (20units) (Promega製)	1.5 μ l
2.5mM dNTPs (N=A,G,C,T) (TOYOBO)	8 μ l
MMTV Reverse Transcriptase (200units) (BRL製)	1 μ l

【0063】(iii) PCR法によるDNA断片の増幅
反応溶液の組成は以下の通りであり、DNA増幅キット、DNA増幅装置、増幅反応条件は、(I)の(iii)と同様で

H₂O

sequencing Kit (USB社製) を用いる従来公知の方法や蛍光物質利用したTaqDye Primer Cycle Sequencing Kit (ABI社製)、DNA増幅装置 (パーキンエルマー・シータス社製) 及びDNA Sequencer 373A (ABI社製) を用いる方法で決定した。

【0052】図1において枠で仕切られたBO-Aの下部に塩基配列決定の方向と距離を示した。決定されたBO-Aの塩基配列は、配列番号: 13に示した219番目のCから1771番目のCに相当する。この塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号: 13の塩基配列の下に示した。

【0053】このアミノ酸配列とBO蛋白のアミノ末端配列 (配列番号: 2) の一部 (16番目のプロリンから25番目のロイシン) やアプロテアーゼで分解した断片のアミノ酸配列 (配列番号: 3から配列番号: 12) の一致が認められる。一致しているアミノ酸配列部分を配列番号: 13に下線で示した。従って、得られたBO-Aは、目的のBO蛋白のcDNAの一部である。

【0054】(II) BO蛋白のカルボキシル末端部分に対応する3'側のcDNA断片の取得

(i) PCR法に用いたプライマーDNAの合成

(I)の(v)で決定されたBO-Aの塩基配列のうち、特異的配列 (配列番号: 13の1692番目のCから1716番目のGまで) のDNAを合成した。このDNAをPCR法のプライマー#3とした。尚、(I)の(i)と同様に5'側には制限酵素EcoRIの認識配列を付けてある。プライマー#3の配列を以下に示す。

【0055】

成し、得たDNAを1st strand cDNA合成に用いるプライマー#5とした。プライマー#5の配列を以下に示す。

【0060】

プライマー#5 5' -GATCGATAAGCTTGTGCGAC(T)₁₇- 3'

【0061】②で得られた全RNA 10 μ l (0.5 μ g) と20 μ Mのプライマー#5、3 μ lを500 μ l容量のチューブ内で混合し、70°Cで10分間インキュベートした後、すぐに水中で冷やした。次に、この得られた混合物4 μ lに対し以下の試薬を混合し、37°Cで45分間インキュベートした。この反応物をPCR法の鋳型DNAとした。以下、この反応物を1st DNA mix(c)とする。

【0062】

ある。

【0064】

58.5 μ l

[10×] Reaction Buffer	10 μ l
dNTPs, mix 1.25mM	16 μ l
プライマー #3 (20 μ M)	5 μ l
プライマー #4 (20 μ M)	5 μ l
1st DNA mix(c)	5 μ l
AmpliTa TM DNA polymerase (5 units/ μ l)	0.5 μ l

【0065】(iv) PCR法で増幅されたDNAの回収と塩基配列の決定

(I) の (iv) と同様に、回収した反応液10 μ l を用いて1.5%アガロース電気泳動で増幅されたDNAのサイズと量を確認した。その結果、約290bpのDNA断片が約2 μ g 増幅されていることがわかった。残りの90 μ l を1.5%アガロース電気泳動にかけ、290bpに相当するバンドを切りだし、DNA精製キット、MERMAIDTM Kit (BIO 101社製) でこのDNAを抽出した。この操作で約0.5 μ g のDNA断片が回収された。以下、このDNA断片をBO-Bという。

【0066】次に得られたBO-Bを制限酵素EcoRIとHind IIIで切断し、あらかじめ同じ制限酵素で切断したプラスミドpUC19にサブクロニングした。その結果得られたBO-Bを含むプラスミドpUCBO-Bの塩基配列を決定した。この場合の塩基配列決定は7-Deaza-Sequencing-Kit (USB社製) を用いる従来公知の方法でおこなった。図1において枠で仕切られたBO-Bの上部に制限酵素認識部位、下部に塩基配列決定の方向と距離を示し、枠の右端にBO-Bを含むプラスミド名としてpUCBO-Bを示した。

【0067】決定されたBO-Bの塩基配列は、配列番号

プライマー #6 5' -CGGATCCAAGGTCAGGGTAAACCTGGT- 3'

【0070】PCR法の鋳型DNAの合成をSuperScriptTM Plasmid System (BRL社製) を用いて行なうと、2本鎖cDNA混合物の5'末端にSalIアダプターが導入される。従って、もう一方のプライマーは、この配列を利用することにした。以下に示す配列を合成し、PCR法のプライマー #7とした。プライマー #7の配列を以下に示す。

【0071】

プライマー #7 5' -TGCACCCACGCGTCCG- 3'

【0072】合成したDNAはそれぞれ200 μ l のTEに溶解し、PCR法のプライマーとして用いた。

【0073】(ii) PCR法に用いた鋳型DNAの調製とDNA断片の増幅

H ₂ O	60.5 μ l
[10×] Reaction Buffer	10 μ l
dNTPs, mix 1.25mM	16 μ l
プライマー #6 (20 μ M)	5 μ l
プライマー #7 (20 μ M)	5 μ l
cDNA mix	3 μ l
AmpliTa TM DNA polymerase (5 units/ μ l)	0.5 μ l

【0076】(iii) PCR法で増幅されたDNAの回収と塩基配列の決定

(II) の (iv) と同様にDNAを回収し、その結果、約350 bpのDNA断片が、約0.5 μ g得られた。以下、このDNA断

号: 13に示した1692番目のCから1959番目のAに相当する。BO-AとBO-Bの塩基配列を比較すると1692番目のCから1771番目のCが完全に一致すること、この塩基配列から予想されるアミノ酸配列とBO蛋白をV8プロテアーゼで分解した断片の配列の内、配列番号: 7の配列と一致すること、その配列のすぐ後にストップコドン(配列番号: 13の塩基配列で1782番目から1784番目) が現われ、3'末端にpoly(A)配列が存在することから、BO-Bは、目的のBO蛋白のカルボキシル末端部分に対応する3'側のcDNA断片である。

【0068】(III) BO蛋白のアミノ末端部分に対応する5'側のcDNA断片の取得

(i) PCR法に用いたプライマーDNAの合成

(I) の (v) で決定されたBO-Aの塩基配列のうち、以下に示す特異的配列(配列番号: 13の322番目から348番目)の相補的配列のDNAを合成した。このDNAをPCR法のプライマー #6とした。プライマー #6の配列を以下に示す。

【0069】

③で得られたpoly(A)⁺RNAを2.5 μ g使用して、SuperScriptTM Plasmid System (BRL社製) により2本鎖cDNA合成し、SalIアダプターの付加及び制限酵素NotIで切断した反応液をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿、乾燥を行ない、最終的にTE 50 μ l に溶解させたサンプルを鋳型DNAとした。以下この鋳型DNAをcDNA mixという。

【0074】PCR法の反応溶液の組成は以下の通りであり、DNA増幅キット、DNA増幅装置、増幅反応条件は、(I) の (iii) と同様である。

【0075】

片をBO-Cという。

【0077】次に得られたBO-Cを制限酵素SalIとBamHIで切断し、あらかじめ同じ制限酵素で切断したプラスミドpUC19にサブクロニングした。その結果得られたBO

-Cを含むプラスミドpUCB0-Cの塩基配列を決定した。この場合の塩基配列決定は7-Deaza-Sequencing-Kit (USB社製)を用いる従来公知の方法でおこなった。図1において枠で仕切られたB0-Cの上部に制限酵素認識部位、下部に塩基配列決定の方向と距離を示し、枠の右端にB0-Cを含むプラスミド名としてpUCB0-Cを示した。決定されたB0-Cの塩基配列は、配列番号: 13に示した1番目のAから348番目のGに相当する。B0-AとB0-Cの塩基配列を比較すると219番目のCから348番目のGまでの配列が完全に一致すること、この塩基配列から予想されるアミノ酸配列(配列番号: 13の塩基配列では180から254番に相当する)とB0蛋白のアミノ末端配列が一致することから、B0-Cは、B0蛋白のアミノ末端部分に対応する5'側のcDNA断片である。

【0078】以上、得られたB0-A、B0-B及びB0-CのDNA断片のオーバーラップする塩基配列部分を考慮し、結合させた全体の塩基配列を配列番号: 13に示した。塩基配列の下段には塩基配列から予想される、66番目から68番目の開始コドンであるATGから始まり終止コドンである1782番目から1785番目のTAGで終了する最も長いオープンリーディングフレームを示してある。

【0079】B0蛋白部分はこのフレーム内に存在する。したがって、B0蛋白は、572個のアミノ酸から成る前駆体として翻訳されると考えられる。配列番号: 13に示したアミノ酸配列部分のうち1番目のメチオニンから約20のアミノ酸は比較的疎水性に富んだアミノ酸が並んでいることから、分泌蛋白質に一般的に見られるシグナル配列と考えられる。B0蛋白のアミノ末端アミノ酸はバリンであり、その前には2つの塩基性アミノ酸(Lys-Arg)が存在している。このアミノ酸配列は、B0前駆体から成熟体(B0蛋白)へのプロセッシングに必要な配列と考えられる。

【0080】配列番号: 13で示した最も長いオープンリーディングフレームを、配列番号: 1にアミノ酸の3文字表記で示した。B0蛋白のアミノ末端配列(配列番号: 2)やプロテアーゼ分解断片の配列(配列番号: 3~配列番号: 12)を下線で示した。したがって、B0蛋白側からの得られた配列と、得られたcDNAから予想されるアミノ酸配列とを総合して考えると、B0蛋白の一次構造は、39番目のバリンから572番目のグルタミン酸まで534個のアミノ酸より成ると考えられる。

【0081】⑤ノザンブロットング法によるB0のmRNAのサイズの同定
ノザンブロットングは、ホルムアルデヒド法により行なった。〔バイオケミストリ、16、4743(197

7)〕、[プロシーディング オブ ザ ナショナルアカデミー オブ サイエンス オブ ザ USA、77、5794(1980)]、[モレキュラー クローニング(1982)]

【0082】③で得られたpoly(A)⁺RNAのうち2.5μgを変性条件下で1.2%アガロース電気泳動し、ブロッティングし、ベイクンしたニトロセルロースフィルターと、⑤の(I)の(iv)で得られたプラスミドpUCB0-Aを制限酵素EcoRIとHindIIIで切断し、アガロース電気泳動にかけ切りだし抽出した、約1.5kbpのB0-AのDNA断片の適量を[α-³²P]dCTPでMultiprime™ DNA Labelling system(アマシャム社製)により標識化したDNA断片とをハイブリダイゼーションさせ、15mM 塩化ナトリウム、1.5mM クエン酸ナトリウムと0.1% SDSを含む溶液で42°Cで30分間洗浄し、風乾させたフィルターのオートラジオグラフィーを行なった。その結果を図2に示した。

【0083】同時に電気泳動したRNAのサイズマーカーから算定された約2kbの位置に1本バンドが出現した(図2に矢印で示す)。従って、B0のmRNAのサイズは、約2kbであり、⑤の(I)~(III)で得られたB0-A、B0-B及びB0-Cを組合せて得られた配列番号: 13のDNAのサイズと一致する。このことは、B0のmRNAは一種類であり、配列番号: 13に示されたDNA配列がB0のmRNA配列をDNAに変換した配列と考えることができる。

【0084】⑦前駆体部分と成熟体のB0(B0蛋白)部分の全体を含むDNA断片の取得

⑥で得られた結果から、B0蛋白に対するmRNAは一種類であり、⑤の(II)と(III)で得られたB0-BとB0-Cの塩基配列を利用すれば、オープンリーディングフレーム(配列番号: 1)全体を含むひと繋ぎのDNA断片として取得できる。このDNA断片の取得はPCR法によって行なった。

【0085】(i)PCR法によるオープンリーディングフレーム全体を含むDNA断片の増幅

⑤の(III)で得られたB0-Cの塩基配列の内、配列番号: 13の第12番目のTから第36番目のTまでの配列と第1878番目のCから第1902番目のGまでの配列の相補的配列のDNAを合成した。それぞれの合成DNAをPCRのプライマー#8、プライマー#9として用いた。また、⑤の(III)で得たcDNA mixをPCRの鋳型DNAとした。

【0086】PCRの反応溶液の組成は以下の通りであり、DNA増幅キット、DNA増幅装置、増幅反応条件は、(I)の(iii)と同様である。

【0087】

H ₂ O	60.5μl
[10×] Reaction Buffer	10μl
dNTPs, mix 1.25mM	16μl
プライマー#8 (20μM)	5μl
プライマー#9 (20μM)	5μl

(III) の (ii) の cDNA mix
AmpliTaQ™ DNA polymerase (5units/ μ l)

5 μ l
0.5 μ l

【0088】(ii) PCRで増幅されたDNAの回収と塩基配列の決定

(II) の (iv) と同様にDNAを回収し、その結果、約1.9 kbpのDNA断片が、約1 μ g得られた。以下、このDNA断片をBO-fullという。

【0089】次に得られたBO-fullを、あらかじめ制限酵素SmaIで切断したプラスミドpUC19にサブクローニングし、BU-fullを含むプラスミドを得た。以下、このプラスミドをpUC-BOという。次にBO-fullの制限酵素地図を作製し、その地図に基づき塩基配列決定のためのサブクローニングを行なった。⑤の(v)のように、塩基配列決定の鑄型DNAは、M13ファージ(M13mp18、M13mp19)のRF DNAにDNA断片をクローニングし、一本鎖DNAとして回収したり[メソッド イン エンザイモロジー, 10 1, 20 (1983)], pUC18、pUC19やpHSG396、pHSG397 (いずれも宝酒造製)のプラスミドにクローニングし、2本鎖DNAとして回収し鑄型DNAとした。この場合の塩基配列決定は、蛍光物質利用したTaq Dye Primer Cycle Sequencing Kit (ABI社製)、DNA増幅装置(パーキンエルマー・シータス社製)及びDNA Sequencer 373A (ABI社製)を用いる方法でおこなった。図1において枠で仕切られたBO-fullの上部に制限酵素認識部位、下部に塩基配列決定の方向と距離を示し、枠の右端にBO-fullを含むプラスミド名としてpUC-BOを示した。決定されたBO

プライマー#10 5'-GGTAAGCTTGGATAAAAGAGTTGCCAGATCAGCCACAG-3'

プライマー#11 5'-CGGAATTCTTACTCGTCAGCTGCGGCG-3'

【0092】PCR法の反応はGene Amp™ kit (パーキンエルマー・ジャパン社製)を用い、同社のDNA Thermal Cyclerにより行なった。反応液の組成は同キットに添付されている説明書に記載されている方法に従った。反応液の入ったチューブをDNA Thermal Cyclerにセットし、以下の条件で反応を行なった。

【0093】95℃ 0.5分
37℃ 0.5分
72℃ 3分

【0094】この反応条件下で反応を35サイクル行なった後、さらに72℃で7分間インキュベートした。反応後、反応液を取り出しこれをクロロホルムにて抽出した。

【0095】次いで、これを1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅されたDNAのサイズと量を確認した。その結果、約1.6kbpのDNA断片が約1 μ g増幅されることがわかった。この1.6kbpのバンドを含むゲルを切りだして、Gene clean II Kit (BIO 101社製)を用いて、キットに添付されている説明書に従ってDNAを抽出

プライマー#12 5'-GCCTCGAGTTTCATACACAATATAACGACCAAA-3'

プライマー#13 5'-GGAAGCTTACCCCTTCTTCTTAGCAGCAATGCT-3'

【0099】ここで、プライマー#12は制限酵素XhoIの

-fullの塩基配列は、配列番号: 13に示した第12番目のTから第1902番目のGまで、完全に一致した配列であった。したがって、このPCRにより配列番号: 1に示したアミノ酸配列に相当する塩基配列を全て含むDNA断片を得ることができた。図1において枠で仕切られたBO-fullには、BO蛋白に対応する領域を斜線で、シグナルペプチドに相当する部分を含む領域をPreProとして示した。また、BO蛋白のアミノ末端に相当する部分をN、カルボキシル末端に相当する部分をCと示した。このBO-fullと名付けたDNA断片を含むプラスミドpUC-BOを、実施例2および実施例3に示す酵母での組み換えBOの発現に必要なプラスミド構築の材料とした。

【0090】実施例2

まず、プラスミドpUC-BOのうち成熟タンパク部分に相当すると予想される塩基配列を、下記プライマー#10、プライマー#11を用いてPCR法により増幅した。プライマー#10には後述するプラスミドへクローニングが容易なように、酵母 α 因子のシグナルペプチドの塩基配列の一部(HindIIIサイトを含む)が含まれている。またプライマー#11にはストップコドンとEcoRIサイトが含まれている。プライマー#10、プライマー#11の配列を以下に示す。

【0091】

し回収した。

【0096】回収したDNAを次に制限酵素EcoRIとHindIII (いずれも東洋紡製)にて消化し、アガロース電気泳動を行なって、約1.6kbpのDNA断片をGene clean II Kitを用いて回収した。得られた1.6kbp DNA断片を発現させるために、酵母において分泌発現が可能のように、分泌発現に必要なシグナルペプチドの塩基配列と転写の終結に必要な塩基配列(ターミネーター)を1.6kbp DNA断片に結合した。

【0097】まず、 α 因子のシグナルペプチド部分の塩基配列を前述のPCR法を用いて増幅し単離した。すなわち、酵母のゲノムDNA(Clontec社より購入)を鑄型DNAとしプライマー#12、#13を用いて α 因子のシグナルペプチド部分の塩基配列を増幅した。増幅後、前述したように反応液をアガロース電気泳動して、増幅したDNA断片を確認して、これをMERMAID kitを用いて抽出し回収した。その結果、約0.5 μ gの約300bpのDNA断片を得た。

【0098】

サイトをプライマー#13は制限酵素HindIIIのサイトを

含んでいるので、得られたDNA断片をXhoIとHindIIIで消化することにより、 α 因子のシグナルペプチドの塩基配列を含んだDNA断片の両末端に、それぞれXhoIサイトとHindIIIサイトを導入できる。

【0100】得られたDNA断片をXhoIとHindIIIで消化して、これとブルースクリプトks⁺ (Stratagene社製)をXhoI、HindIIIで消化したラージフラグメントをライゲーションした。ライゲーション反応はライゲーションキット(宝酒造製)を用いてキットに添付されている説明書に従って行なった。ライゲーション後、反応液で大腸菌DH5を形質転換した。形質転換はコンピテントセルDH5(東洋紡製)を用いて公知の方法[モレキュラー クローニング(1982)]により行なった。形質転換の結果、得られたアンピシリン耐性の菌株よりプラスミドDNA(以下、pB α とする)を公知の方法にて調製した。

プライマー#14 5'-CCGAATTCATTGAATTGAATGAAATCGATAGA-3'

プライマー#15 5'-CCGGATCCGATCGCATATCGGTTTTTCGAAACGCCAGAATTTTCGA-3'

【0104】増幅後、反応液をアガロース電気泳動して増幅したDNA断片を確認して、これをMERMAID kitを用いて抽出し回収した。その結果、約0.5 μ gの約300bpのDNA断片を得た。プライマー#14はEcoRIサイトをプライマー#15はSphI、BamHIサイトを含んでおり、得られた断片をEcoRIとBamHI(いずれも東洋紡製)で消化することにより、PGK遺伝子のターミネーター配列の両端に、それぞれEcoRIサイトとBamHIサイトを導入することができる。得られたPGK遺伝子のターミネーター断片を、EcoRIとBamHIで消化し、これと前述のpBS α をEcoRIとBamHIで消化したラージフラグメントを同様にライゲーションし形質転換を行なった。得られたアンピシリン耐性の菌株よりプラスミドDNAを調製し、これをpBOGS α とし、以下の実験に供した。

【0105】このようにして作製された融合遺伝子が、 α 因子の開始コドンであるメチオニンから順次アミノ酸に翻訳されると、グリシン-バリン-セリン-ロイシン-アスパラギン酸-リシン-アルギニン-バリン-アラニン-グルタミン-イソロイシン-セリン-プロリンという配列になる。このうち最初のグリシンから7番めのアルギニンまでは α 因子のアミノ酸配列であり、8番めのバリンからはBO成熟体のN末端領域のアミノ酸を示していた。この配列中のリシン-アルギニンの配列は α 因子のシグナルペプチドがプロセッシングを受ける部分であり、この部分でBOタンパクが切りだされ分泌されるものと予想される。

【0106】プラスミドpBOG α をXhoIとSphIで消化してアガロース電気泳動し、約2.2kbpのDNA断片を確認し、この断片をGENE CLEAN II kitにより回収した。このDNA断片を、酵母-大腸菌のシャトルベクターであるpYES2をXhoIとSphIで消化したラージフラグメントと前述の如くライゲーションし、その反応液で大腸菌DH5を前述の如くトランスフォーメーションした。

【0101】次にこのpB α をHindIIIとEcoRIで切断して得られたラージフラグメントと、前述したPCR法で増幅された1.6kbp DNA断片をHindIIIとEcoRIで切断したフラグメントをライゲーションした。ライゲーション後、前述したようにこれを用いて大腸菌DH α を形質転換した。得られた形質転換体より前述と同様にプラスミドを調製した。このプラスミドをpB0 α とし、以下の実験に用いた。

【0102】次にpB0 α の挿入DNA断片の下流に、酵母PGK遺伝子のターミネーター配列を組み込んだ。そのためにPGK遺伝子のターミネーター配列をPCR法で増幅し単離した。鋳型DNAとしては酵母ゲノムDNAを、プライマーとしては下記に示したプライマー#14、#15を用いた。

【0103】

【0107】得られた形質転換体より前述の如くプラスミドを回収しこれをpYES-BOとした。図3にpYES-BOのおおよその構造を示す。pYES2はXhoI、SphIサイトの上流に酵母のGAL1遺伝子のプロモーターを持つプラスミドで、XhoIサイト側に遺伝子上流、SphIサイト側に遺伝子下流がくるような方向に遺伝子を挿入することで、遺伝子がGAL1プロモーターで転写されうようになる。すなわちここで取得されたプラスミドでは、挿入されたDNA断片がGAL1プロモーターで転写されう構造を有していることになる。従って、このDNA断片がBOをコードしていれば、プラスミドを酵母に導入することでBOが発現することが期待できる。

【0108】実施例3

実施例1記載のプラスミドpUC-BOにおいてはBO遺伝子のオープンリーディングフレームの5'側と3'側にpUC-19由来のEcoRI認識部位とSphI認識部位が存在する。このEcoRI認識部位に次の2本鎖合成オリゴDNAを挿入しEcoRI認識部位をXhoI認識部位に変換したプラスミドpUC-BOXを作成した。

【0109】5'-AATTGCTCGAGATCGATCTAGAC-3'
3'-CGAGCTCTAGCTAGATCTGTAA-5'

【0110】次に、このpUC-BOXからBO遺伝子を含む約1.9kbpのXhoI-SphI断片を回収し、XhoIとSphIで切断した前述のプラスミドpYESにサブクローニングしプラスミドpYES-FBOを得た。

【0111】実施例4

実施例2及び実施例3で得られたプラスミドpYES-BO及びpYES-FBOを用いて酵母SHY2を形質転換した。形質転換の方法はLaboratory Course Manual for Methods In Yeast Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory)に記載されている方法にしたがって行なった。

【0112】以下、プラスミドpYES-BOを用いた場合について詳細に記載する。SHY2の性状は(α 、ste-VC9、

ura3-52, trp1-289, leu2-3, leu2-112, his3-1, can1-100)であり、この株はロイシンの存在しない培地では成育できない。この株がpYES2-B0を保持すればpYES-B0の持つロイシン合成遺伝子の働きによりロイシンが含まれていない培地でも成育できる、いわゆるロイシン非要求性の株となる。従って、pYES-B0による形質転換体の酵母はロイシン非要求性となる。

【0113】形質転換を行なった結果、5個の形質転換体を得られ、そのうちB02株とした形質転換体酵母を以下の実験に供した。

【0114】B02株の培養は次のようにして行なった。B02株を下記組成のSDG培地10mlに接種して一晩30℃で前培養した。

【0115】0.67 % bacto yeast nitrogen base (w/o amino acids)

2 % ガラクトース

0.002% ウラシル

0.002% ヒスチジン

0.002% トリプトファン

【0116】前培養液0.5mlを100mlのSDG培地に接種して、30℃で一晩振とう培養しOD₆₁₀を経時的に測定した。

【0117】OD₆₁₀が4.0に達した時点で培養をやめ、遠心分離(8000×g、10分)により菌体を取り除き、培養上清を回収して以下の実験に供した。またコントロールとしては、pYES2で形質転換されたSHY2(以下、コントロール株とする)に上記と同じ操作を行なって回収された培養上清を用いた。

【0118】培養上清中に発現したB0が含まれているかを調べるために、まずB02株とコントロール株の培養上清をそれぞれCentrifugal Ultrafree-20(分子量10,000カット、ミリポア社製)による限外濃縮により約50倍に濃縮した。また、回収した菌体は5mlの50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.0)-1mM PMSFに懸濁し、ボールミル破砕機(ビーブラウンテック製)により破砕した。破砕後懸濁液を遠心分離し上清を菌体内画分として使用した。

【0119】次に、培養上清中のB0遺伝子の発現を調べるために、菌体内画分と培養上清画分のB0活性の測定を行なった。B0活性の測定は以下のようにして行った。0.1mg/mlのビリルビン(シグマ社製)を1mM EDTA-0.2M Tris-HCl(pH8.0)に溶解した溶液1mlとサンプル0.1mlを混合して、37℃で20分反応後、ブランクとの吸光度の差の有無により活性の存在を判定する。尚、各サンプルは、以下のようにして調製した。

【0120】

サンプルA: B02株の培養上清を濃縮(50倍)

サンプルB: B02株の菌体を破砕後濃縮(20倍)

サンプルC: コントロール株の培養上清を濃縮(50倍)

サンプルD: コントロール株の菌体を破砕後濃縮(20

倍)

【0121】B0活性があればビリルビンの吸光度のピークが減少するはずである。その結果を、図4及び図5に示した。培養上清を用いた実験では、コントロール株の培養上清を加えた場合、ビリルビンの吸光度のピークは減少しなかった。このとき、この上清にミロセシウム属由来のB0(天野製薬製)を加えると、ビリルビンのピークは著しく減少した。

【0122】以上のことから、コントロール株の培養上清はB0活性を示すものを含んでいないし、カビB0の活性を完全に阻害するものも含んでいないことが明らかとなった。従って、SHY2に導入したDNA断片が発現して組み換えB0が分泌されていれば、その活性を検出できることになる。

【0123】B02株の培養上清を加えた実験では、図5から明らかなようにビリルビンの吸光度のピークが著しく減少した。すなわち、導入したDNA断片の存在に依存して培養上清にB0活性が検出できた。菌体内画分を用いた実験においても同様に導入したcDNAの存在に依存してB0活性が検出された。

【0124】次にこのビリルビン分解活性が発現したB0によるものであることをウエスタンブロットを用いた解析により更に確認した。前述の如く調製されたコントロール株とB02株の培養上清濃縮液をそれぞれSDS-PAGE電気泳動した。SDS-PAGE電気泳動はMolecular Cloningに記載されている方法に準じて行なった。電気泳動後、ゲル上に分離されたタンパクバンドをPVDF膜(ミリポア社製)にMultiphor II(LKB社製)を用いて電氣的にトランスファーした。その後このPVDF膜と抗B0ウサギ血清を用いて、Amplified Alkaline Phosphatase Goat Anti-Rabbit Immun-Blot Assay Kit(バイオラッド社製)によりウエスタンブロットを行なった。ウエスタンブロットの方法はキットに添付されている説明書にしたがって行なった。その結果を図6に示した。

【0125】レーン2にはカビ由来B0がアプライされており、約60kDaの位置にバンドが検出された。コントロール株の培養上清濃縮液を流したレーン4では60kDaの位置にはバンドは観察されなかった。この時B02株の培養上清濃縮液を流したレーン3では図6より明らかなように60kDaの位置にバンドが観察された。したがって、遺伝子の存在に依存してB0と同じサイズのB0と同じ抗原性を有するバンドが観察されたことになる。このバンドは発現された組み換えB0に由来するものと考えられる。

【0126】以上のことから導入されたDNA断片がB0タンパクをコードする遺伝子断片であると示唆され、得られた遺伝子断片がB0をコードするB0遺伝子であることが明らかとなった。

【0127】プラスミドpYES-FB0で酵母SHY2を形質転換し、得られた形質転換酵母を上記と同様にSDG培地を用いて培養した。菌体内画分において上記と同様に

成熟B0蛋白の発現が確認された。

【0128】

【発明の効果】本発明により、B0をコードする遺伝子が提供され、該遺伝子を組み込んだ形質転換体を培養することにB0を製造することができる。このようにして製造されたB0は、分析用酵素として利用され、産業上に大

く貢献できる。

【0129】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：534

配列の型：アミノ酸

配列

Val Ala Gln Ile Ser Pro Gln Tyr Pro Met Phe Thr Val Pro Leu	15
Pro Ile Pro Pro Val Lys Gln Pro Arg Leu Thr Val Thr Asn Pro	30
Val Asn Gly Gln Glu Ile Trp Tyr Tyr Glu Val Glu Ile Lys Pro	45
Phe Thr His Gln Val Tyr Pro Asp Leu Gly Ser Ala Asp Leu Val	60
Gly Tyr Asp Gly Met Ser Pro Gly Pro Thr Phe Gln Val Pro Arg	75
Gly Val Glu Thr Val Val Arg Phe Ile Asn Asn Ala Glu Ala Pro	90
Asn Ser Val His Leu His Gly Ser Phe Ser Arg Ala Ala Phe Asp	105
Gly Trp Ala Glu Asp Ile Thr Glu Pro Gly Ser Phe Lys Asp Tyr	120
Tyr Tyr Pro Asn Arg Gln Ser Ala Arg Thr Leu Trp Tyr His Asp	135
His Ala Met His Ile Thr Ala Glu Asn Ala Tyr Arg Gly Gln Ala	150
Gly Leu Tyr Met Leu Thr Asp Pro Ala Glu Asp Ala Leu Asn Leu	165
Pro Ser Gly Tyr Gly Glu Phe Asp Ile Pro Met Ile Leu Thr Ser	180
Lys Gln Tyr Thr Ala Asn Gly Asn Leu Val Thr Thr Asn Gly Glu	195
Leu Asn Ser Phe Trp Gly Asp Val Ile His Val Asn Gly Gln Pro	210
Trp Pro Phe Lys Asn Val Glu Pro Arg Lys Tyr Arg Phe Arg Phe	225
Leu Asp Ala Ala Val Ser Arg Ser Phe Gly Leu Tyr Phe Ala Asp	240
Thr Asp Ala Ile Asp Thr Arg Leu Pro Phe Lys Val Ile Ala Ser	255
Asp Ser Gly Leu Leu Glu His Pro Ala Asp Thr Ser Leu Leu Tyr	270
Ile Ser Met Ala Glu Arg Tyr Glu Val Val Phe Asp Phe Ser Asp	285
Tyr Ala Gly Lys Thr Ile Glu Leu Arg Asn Leu Gly Gly Ser Ile	300
Gly Gly Ile Gly Thr Asp Thr Asp Tyr Asp Asn Thr Asp Lys Val	315
Met Arg Phe Val Val Ala Asp Asp Thr Thr Gln Pro Asp Thr Ser	330
Val Val Pro Ala Asn Leu Arg Asp Val Pro Phe Pro Ser Pro Thr	345
Thr Asn Thr Pro Arg Gln Phe Arg Phe Gly Arg Thr Gly Pro Thr	360
Trp Thr Ile Asn Gly Val Ala Phe Ala Asp Val Gln Asn Arg Leu	375
Leu Ala Asn Val Pro Val Gly Thr Val Glu Arg Trp Glu Leu Ile	390
Asn Ala Gly Asn Gly Trp Thr His Pro Ile His Ile His Leu Val	405
Asp Phe Lys Val Ile Ser Arg Thr Ser Gly Asn Asn Ala Arg Thr	420
Val Met Pro Tyr Glu Ser Gly Leu Lys Asp Val Val Trp Leu Gly	435
Arg Arg Glu Thr Val Val Val Glu Ala His Tyr Ala Pro Phe Pro	450
Gly Val Tyr Met Phe His Cys His Asn Leu Ile His Glu Asp His	465
Asp Met Met Ala Ala Phe Asn Ala Thr Val Leu Pro Asp Tyr Gly	480
Tyr Asn Ala Thr Val Phe Val Asp Pro Met Glu Glu Leu Trp Gln	495
Ala Arg Pro Tyr Glu Leu Gly Glu Phe Gln Ala Gln Ser Gly Gln	510
Phe Ser Val Gln Ala Val Thr Glu Arg Ile Gln Thr Met Ala Glu	525
Tyr Arg Pro Tyr Ala Ala Ala Asp Glu	534

【0130】配列番号：2

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：25

配列

Val Ala Gln Ile Ser Pro Gln Tyr Pro Met Phe Thr Val Pro Leu	15
Pro Ile Pro Pro Val Lys Gln Pro Arg Leu	25

【0131】配列番号：3

配列の型：アミノ酸

配列の長さ：12

配列		
Ile Gln Thr Met Ala Glu Tyr Arg Pro Tyr Ala Ala	12	
【0132】配列番号: 4	配列の型: アミノ酸	
配列の長さ: 7		
配列		
Asp Tyr Tyr Tyr Pro Asn Arg	7	
【0133】配列番号: 5	配列の型: アミノ酸	
配列の長さ: 8		
配列		
Val Pro Phe Pro Ser Pro Thr Thr	8	
【0134】配列番号: 6	配列の型: アミノ酸	
配列の長さ: 17		
配列		
Leu Thr Val Thr Asn Pro Val Asn Gly Gln Glu Ile Trp Tyr Tyr	15	
Glu Val	17	
【0135】配列番号: 7	配列の型: アミノ酸	
配列の長さ: 9		
配列		
Tyr Arg Pro Tyr Ala Ala Ala Asp Glu	9	
【0136】配列番号: 8	配列の型: アミノ酸	
配列の長さ: 10		
配列		
Phe Ser Asp Tyr Ala Gly Lys Thr Ile Glu	10	
【0137】配列番号: 9	配列の型: アミノ酸	
配列の長さ: 8		
配列		
Leu Trp Gln Ala Arg Pro Tyr Glu	8	
【0138】配列番号: 10	配列の型: アミノ酸	
配列の長さ: 15		
配列		
Phe Gln Ala Gln Ser Gly Gln Phe Ser Val Gln Ala Val Thr Glu	15	
【0139】配列番号: 11	配列の型: アミノ酸	
配列の長さ: 10		
配列		
Thr Leu Trp Tyr His Asp His Ala Met His	10	
【0140】配列番号: 12	配列の型: アミノ酸	
配列の長さ: 28		
配列		
Asn Ala Tyr Arg Gly Gln Ala Gly Leu Tyr Met Leu Thr Asp Pro	15	
Ala Glu Asp Ala Leu Asn Leu Pro Ser Gly Tyr Gly Glu	28	
【0141】配列番号: 13	配列の型: 核酸	
配列の長さ: 1959		
配列		
ACCAGACAAA CTTGAGCTTG CTTGACTCGG AGTCCTTTAG TTTTGCCTTT CATTTACAGT	60	
CCAAG ATG TTC AAA CAC ACA CTT GGA GCT GCT GCC CTC AGC TTG CTT	107	
Met Phe Lys His Thr Leu Gly Ala Ala Ala Leu Ser Leu Leu		
-38 -35 -30 -25		
TTC AAC AGC AAT GCT GTC CAG GCA AGC CCC GTC CCC GAG ACC TCA CCG	155	
Phe Asn Ser Asn Ala Val Gln Ala Ser Pro Val Pro Glu Thr Ser Pro		
-20 -15 -10		

GCA ACT GGA CAT CTC TTC AAG CGA GTT GCC CAG ATC AGC CCA CAG TAT	203
Ala Thr Gly His Leu Phe Lys Arg Val Ala Gln Ile Ser Pro Gln Tyr	
-5 1 5	
CCC ATG TTC ACA GTA CCA CTG CCA ATT CCT CCT GTT AAG CAG CCC CGC	251
Pro Met Phe Thr Val Pro Leu Pro Ile Pro Pro Val Lys Gln Pro Arg	
10 15 20	
TTG ACT GTA ACC AAT CCT GTG AAT GGA CAA GAG ATC TGG TAC TAT GAG	299
Leu Thr Val Thr Asn Pro Val Asn Gly Gln Glu Ile Trp Tyr Tyr Glu	
25 30 35 40	
GTC GAG ATC AAG CCC TTC ACT CAC CAG GTT TAC CCT GAC CTT GGA TCC	347
Val Glu Ile Lys Pro Phe Thr His Gln Val Tyr Pro Asp Leu Gly Ser	
45 50 55	
GCT GAT CTG GTC GGG TAT GAT GGA ATG TCT CCT GGC CCT ACT TTC CAG	395
Ala Asp Leu Val Gly Tyr Asp Gly Met Ser Pro Gly Pro Thr Phe Gln	
60 65 70	
GTT CCT CGT GGA GTT GAA ACA GTT GTC CGC TTC ATT AAC AAT GCT GAG	443
Val Pro Arg Gly Val Glu Thr Val Val Arg Phe Ile Asn Asn Ala Glu	
75 80 85	
GCT CCT AAC TCC GTT CAC CTG CAC GGA TCA TTC TCT CGT GCC GCC TTT	491
Ala Pro Asn Ser Val His Leu His Gly Ser Phe Ser Arg Ala Ala Phe	
90 95 100	
GAC GGA TGG GCA GAG GAC ATC ACC GAG CCT GGC AGC TTC AAA GAC TAT	539
Asp Gly Trp Ala Glu Asp Ile Thr Glu Pro Gly Ser Phe Lys Asp Tyr	
105 110 115 120	
TAC TAC CCA AAT AGA CAG TCT GCT CGT ACC CTA TGG TAC CAC GAT CAT	587
Tyr Tyr Pro Asn Arg Gln Ser Ala Arg Thr Leu Trp Tyr His Asp His	
125 130 135	
GCT ATG CAT ATC ACT GCT GAG AAC GCC TAC CGT GGC CAG GCT GGT CTC	635
Ala Met His Ile Thr Ala Glu Asn Ala Tyr Arg Gly Gln Ala Gly Leu	
140 145 150	
TAC ATG CTC ACT GAC CCA GCC GAA GAC GCT CTC AAC TTG CCA AGT GGA	683
Tyr Met Leu Thr Asp Pro Ala Glu Asp Ala Leu Asn Leu Pro Ser Gly	
155 160 165	
TAT GGC GAG TTC GAT ATT CCA ATG ATC CTC ACG TCC AAG CAA TAT ACC	731
Tyr Gly Glu Phe Asp Ile Pro Met Ile Leu Thr Ser Lys Gln Tyr Thr	
170 175 180	
GCA AAC GGC AAC TTG GTC ACC ACT AAT GGA GAG CTG AAC TCA TTC TGG	779
Ala Asn Gly Asn Leu Val Thr Thr Asn Gly Glu Leu Asn Ser Phe Trp	
185 190 195 200	
GGT GAT GTA ATT CAC GTG AAC GGT CAA CCC TGG CCT TTC AAG AAC GTT	827
Gly Asp Val Ile His Val Asn Gly Gln Pro Trp Pro Phe Lys Asn Val	
205 210 215	
GAG CCT CGC AAA TAT CGA TTC CGC TTC CTC GAT GCC GCA GTT TCT CGC	875
Glu Pro Arg Lys Tyr Arg Phe Arg Phe Leu Asp Ala Ala Val Ser Arg	
220 225 230	
TCT TTC GGC CTT TAC TTT GCT GAT ACT GAT GCT ATC GAC ACT CGC TTG	923
Ser Phe Gly Leu Tyr Phe Ala Asp Thr Asp Ala Ile Asp Thr Arg Leu	
235 240 245	

CCT TTC AAG GTT ATT GCC TCC GAT TCT GGT CTT CTT GAA CAC CCT GCC	971
Pro Phe Lys Val Ile Ala Ser Asp Ser Gly Leu Leu Glu His Pro Ala	
250 255 260	
GAT ACC AGC TTG CTG TAC ATT TCC ATG GCC GAG CGT TAC GAA GTT GTG	1019
Asp Thr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Met Ala Glu Arg Tyr Glu Val Val	
265 270 275 280	
TTT GAC TTC TCC GAC TAT GCT GGC AAG ACT ATT GAA CTC CGC AAC CTG	1067
Phe Asp Phe Ser Asp Tyr Ala Gly Lys Thr Ile Glu Leu Arg Asn Leu	
285 290 295	
GGC GGT AGC ATT GGC GGC ATC GGA ACA GAT ACC GAC TAT GAC AAC ACC	1115
Gly Gly Ser Ile Gly Gly Ile Gly Thr Asp Thr Asp Tyr Asp Asn Thr	
300 305 310	
GAC AAG GTC ATG CGT TTC GTG GTA GCA GAC GAC ACA ACT CAG CCA GAT	1163
Asp Lys Val Met Arg Phe Val Val Ala Asp Asp Thr Thr Gln Pro Asp	
315 320 325	
ACC TCA GTT GTT CCT GCT AAC CTT CGT GAT GTT CCC TTC CCC TCT CCC	1211
Thr Ser Val Val Pro Ala Asn Leu Arg Asp Val Pro Phe Pro Ser Pro	
330 335 340	
ACC ACA AAC ACC CCC CGA CAG TTC CGC TTT GGT CGC ACC GGT CCT ACC	1259
Thr Thr Asn Thr Pro Arg Gln Phe Arg Phe Gly Arg Thr Gly Pro Thr	
345 350 355 360	
TGG ACT ATT AAT GGT GTT GCT TTT GCT GAT GTT CAA AAC CGT CTG CTT	1307
Trp Thr Ile Asn Gly Val Ala Phe Ala Asp Val Gln Asn Arg Leu Leu	
365 370 375	
GCA AAC GTA CCC GTT GGT ACT GTC GAG CGT TGG GAG CTC ATC AAC GCC	1355
Ala Asn Val Pro Val Gly Thr Val Glu Arg Trp Glu Leu Ile Asn Ala	
380 385 390	
GGT AAC GGT TGG ACG CAC CCT ATT CAC ATC CAT CTT GTC GAC TTC AAG	1403
Gly Asn Gly Trp Thr His Pro Ile His Ile His Leu Val Asp Phe Lys	
395 400 405	
GTG ATT TCT CGT ACT TCC GGC AAC AAC GCG CGC ACA GTC ATG CCA TAC	1451
Val Ile Ser Arg Thr Ser Gly Asn Asn Ala Arg Thr Val Met Pro Tyr	
410 415 420	
GAG TCC GGT CTC AAA GAC GTT GTC TGG CTT GGT CGC CGT GAA ACT GTG	1499
Glu Ser Gly Leu Lys Asp Val Val Trp Leu Gly Arg Arg Glu Thr Val	
425 430 435 440	
GTT GTT GAG GCT CAT TAC GCG CCT TTC CCT GGT GTA TAC ATG TTC CAT	1547
Val Val Glu Ala His Tyr Ala Pro Phe Pro Gly Val Tyr Met Phe His	
445 450 455	
TGC CAC AAT TTG ATT CAC GAG GAT CAC GAT ATG ATG GCT GCC TTT AAC	1595
Cys His Asn Leu Ile His Glu Asp His Asp Met Met Ala Ala Phe Asn	
460 465 470	
GCC ACC GTC CTG CCA GAT TAT GGC TAT AAT GCC ACT GTT TTC GTT GAC	1643
Ala Thr Val Leu Pro Asp Tyr Gly Tyr Asn Ala Thr Val Phe Val Asp	
475 480 485	
CCT ATG GAA GAG CTT TGG CAG GCT CGT CCT TAT GAA CTC GGC GAG TTC	1691
Pro Met Glu Glu Leu Trp Gln Ala Arg Pro Tyr Glu Leu Gly Glu Phe	
490 495 500	
CAG GCT CAG AGT GGC CAG TTC AGC GTT CAG GCT GTT ACT GAG CGT ATT	1739
Gln Ala Gln Ser Gly Gln Phe Ser Val Gln Ala Val Thr Glu Arg Ile	

505 510 515 520
 CAG ACT ATG GCT GAA TAC AGA CCT TAC GCC GCA GCT GAC GAG 1781
 Gln Thr Met Ala Glu Tyr Arg Pro Tyr Ala Ala Ala Asp Glu

525 330 534
 TAGAAACATA CCAGGTATGG TATTGATGAA GGAAGCCAGG AAATCTCATG AATAACTTGT 1841
 ATCTATTCCA TTCGTGCTAC ACCATATAGG CCATGACCTG CAGCTAGACT GTTAGGCTGA 1901
 GCATCACTTT TTACCGCTGA TATGGAGACT ACATTTGAAG GAAAAAAAAA AAAAAAAAA 1959

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpUCB0-A、プラスミドpUCB0-B、プラスミドpUCB0-C及びプラスミドpUC-B0の制限酵素地図を示す。

【図2】ノザンブローディングのパターンを示す。

【図3】プラスミドpYES-B0のおおよその構造を示す。

【図4】B02株及びコントロール株の培養上清中のB0活性の測定結果を示す。図中で①はビリルビンを、②はビリルビン+サンプルCを③はビリルビン+サンプルC+

ビリルビンオキシダーゼを、④はビリルビン+サンプルAの結果を示す。

【図5】B02株及びコントロール株の菌体中のB0活性の測定結果を示す。図中で①はビリルビンを、②はビリルビン+サンプルDを③はビリルビン+サンプルD+ビリルビンオキシダーゼを、④はビリルビン+サンプルBの結果を示す。

【図6】B02株及びコントロール株の培養上清濃縮液によるウエスタンブロットの結果を示す。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁵

C 1 2 R 1:645)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所